

Estimación de la dieta de *Paralichthys orbignyanus* en la Laguna de Rocha inferida a través del análisis de los perfiles de ácidos grasos (QFASA)

Lic. Larisa Magnone

Tesis presentada como requisito
para obtener el título de
Magister en Ciencias Biológicas

Pedeciba Biología / Zoología
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Orientador: Dr. Martín Bessonart

Montevideo
Octubre, 2015

Agradecimientos

A Martín Bessonart director de mi tesis, por la confianza depositada en mi y por ayudarme y acompañarme a transitar este camino.

A Felipe García, Natalia Venturini y Leandro Bergamino por los valiosos comentarios acerca de esta tesis.

A María Salhi por todos los conocimientos transmitidos y la ayuda prestada durante toda la tesis.

A Martín Rocamora por enseñarme y ayudarme en la parte matemática sin la cual habría sido casi imposible realizar esta tesis. Por el ánimo y el apoyo durante este proceso.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

A la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA) por el uso de las facilidades en la Estación de Investigaciones Marinas y Acuicultura y por todo el apoyo que me brindaron durante la tesis.

A Juan Gadea, Florencia Féola y Jorge Dieguez, por su amistad, el compañerismo y la ayuda durante y después de la tesis.

A mis compañeros de Laboratorio, Sabrina, Nacho, Gisela, Cecilia, Vanesa, Ernesto, Joaquin, por las horas de molestias causadas el ánimo y por los buenos ratos.

A Estela y José Luis, por dejarme hacer los muestreos en la Laguna de Rocha durante sus faenas.

A Ana Pita, por su amistad, optimismo contagioso y buenas charlas.

A Piola, por su apoyo incondicional y constante. Gracias amiga!

A mi familia. A mis hermanos, Naty y Rodri, simplemente por ser y estar ahí. Por darme esos soles que tan motivadores son en mi vida, por aconsejarme y por acompañarme siempre. A mis padres, por el amor, la motivación y la confianza. Los quiero!

ÍNDICE

| | |
|--------------------------|------|
| Índice de Tablas | v |
| Índice de Figuras | vii |
| Resumen | viii |
| Abstract | x |

Introducción General

| | |
|---|---|
| Los lenguados | 1 |
| El abordaje del análisis cuantitativo del perfil de ácidos grasos | 3 |
| La Laguna de Rocha | 4 |
| Modelos tipo QFASA | 5 |
| Hipótesis de trabajo | 6 |
| Objetivo general | 6 |

Capítulo 1. Experiencias de calibración y validación del modelo

| | |
|---|----|
| 1.1 Introducción | |
| 1.1.1 Coeficientes de calibración | 7 |
| 1.1.2 Reservas lipídicas | 8 |
| 1.1.3 Ácidos grasos dietarios | 9 |
| 1.1.4 Objetivos específicos | 10 |
| 1.2 Materiales y métodos | |
| 1.2.1 Muestreo de <i>Paralichthys orbignyanus</i> en la naturaleza | 12 |
| 1.2.2 Índices | 12 |
| 1.2.3 Análisis estadísticos | 12 |
| 1.2.4 Diseño experimental y obtención de ejemplares de <i>Paralichthys orbignyanus</i> para los experimentos de alimentación controlada | 13 |
| 1.2.5 Ítems presa en los ensayos de alimentación controlada | 14 |
| 1.2.6 Biopsias musculares en lenguados vivos y colecta de hígado | 15 |
| 1.2.7 Análisis bioquímicos y cromatografía gaseosa | 16 |
| 1.2.8 Coeficientes de calibración | 18 |
| 1.2.9 Construcción de los subconjuntos de ácidos grasos a ensayar | 19 |
| 1.2.10 Análisis cuantitativo del perfil de Ácidos grasos (QFASA por sus siglas en inglés) | 21 |
| 1.2.11 Validación del modelo en condiciones experimentales | 24 |
| 1.3 Resultados | |
| 1.3.1 <i>Paralichthys orbignyanus</i> en la naturaleza e índices | 26 |
| 1.3.2 Coeficientes de calibración | 28 |
| 1.3.3 Validación del modelo QFASA para <i>Paralichthys orbignyanus</i> | 52 |
| 1.3.4 Tejido de reserva (músculo con piel vs hígado) | 55 |
| 1.3.5 Subconjuntos de AG | 56 |
| 1.3.6 Grupo pejerrey vs grupo lacha | 57 |

| | | |
|--|--|----|
| 1.4 | Discusión | |
| 1.4.1 | Identificación del sitio de reserva energética en <i>Paralichthys orbignyanus</i> | 58 |
| 1.4.2 | Experiencias de alimentación controlada y coeficientes de calibración | 60 |
| 1.4.3 | Subconjuntos de AG durante la validación del modelo QFASA | 61 |
| 1.4.4 | Dietas y lugar de reservorio de energía durante la validación del modelo QFASA | 63 |
| Capítulo 2. Estimación de la dieta de <i>Paralichthys orbignyanus</i> en la naturaleza (Laguna de Rocha) | | |
| 2.1 | Introducción | 65 |
| 2.2 | Materiales y Métodos | |
| 2.2.1 | Área de estudio | 69 |
| 2.2.2 | Muestreo de lenguados adultos y presas potenciales en la laguna de Rocha | 69 |
| 2.2.3 | Ánálisis bioquímico y cromatografía de gases | 70 |
| 2.2.4 | Análisis exploratorio y modelo matemático | 70 |
| 2.3 | Resultados | |
| 2.3.1 | Lípidos y ácidos grasos de presas potenciales y lenguados de la Laguna de Rocha | 72 |
| 2.3.2 | Ánálisis exploratorio | 76 |
| 2.3.3 | Estimación cuantitativa de la dieta de <i>P. orbignyanus</i> en la Laguna de Rocha | 77 |
| 2.4 | Discusión | 80 |
| Conclusiones generales | | 84 |
| Perspectivas | | 85 |
| Referencias bibliográficas | | 87 |
| Anexo I. Protocolo experimental | | |
| Protocolo: biopsia muscular dorsal en <i>Paralichthys orbignyanus</i> | | 96 |
| Anexo II. Artículos Publicados | | |
| Magnone, L., Bessonart, M., Rocamora, M. Gadea, J. & Salhi, M. 2015. Diet estimation of <i>Paralichthys orbignyanus</i> in a coastal lagoon via quantitative fatty acid signature analysis. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 462:36-49. | | |
| Magnone, L., Bessonart, M. Gadea, J. & Salhi, M. 2015. Trophic relationships in an estuarine environment: A quantitative fatty acid analysis signatura approach. Estuarine, Coastal and Shelf Science 166:24-33 110 | | |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| Tabla 1.1. Subconjuntos de ácidos grasos utilizados en el modelo QFASA | 20 |
| Tabla 1.2. Largo total y Peso de <i>Paralichthys orbignyanus</i> | 26 |
| Tabla 1.3. Factor de condición, Índice hepatosomático e Índice gonadosomático de <i>Paralichthys orbignyanus</i> | 26 |
| Tabla 1.4. Porcentaje de lípidos en músculo con piel e hígado de lenguados adultos pre y post desove | 28 |
| Tabla 1.5. Incremento de peso en los dos grupos de lenguados del experimento de alimentación controlada | 28 |
| Tabla 1.6. Porcentaje de lípidos y humedad de <i>Paralichthys orbignyanus</i> , <i>Odonthestes argentinensis</i> y <i>Brevoortia aurea</i> del experimento de alimentación controlada | 30 |
| Tabla 1.7. Comparación entre el perfil de AG de biopsia y trozo grande de músculo con piel | 32 |
| Tabla 1.8. Evolución del perfil de AG de los músculos con piel de <i>Paralichthys orbignyanus</i> alimentados con <i>Odonthestes argentinensis</i> durante las experiencias de alimentación controlada y perfil de AG de <i>O. argentinensis</i> | 34 |
| Tabla 1.9. Evolución del perfil de AG de los músculos con piel de <i>Paralichthys orbignyanus</i> alimentados con <i>Brevoortia aurea</i> durante las experiencias de alimentación controlada y perfil de AG de <i>B. aurea</i> | 36 |
| Tabla 1.10. Perfil de AG de los hígados de los lenguados alimentados con pejerrey, de hígado de los lenguados iniciales y del pejerrey | 42 |
| Tabla 1.11. Perfil de AG de los hígados de los lenguados alimentados con lacha, de hígado de los lenguados iniciales y de la lacha | 44 |
| Tabla 1.12. Coeficientes de calibración para lenguados alimentados con pejerrey y con lacha en la semana 5, 12 y 20 para músculo con piel y en la semana 20 para hígado | 48 |
| Tabla 1.13. Estimación del porcentaje de la presa consumida durante los experimentos de alimentación controlada en el proceso de validación experimental del modelo QFASA | 54 |
| Tabla 2.1. Cantidad de individuos y de muestras analizadas para realizar la base de datos de ácidos grasos de las presas potenciales para <i>Paralichthys orbignyanus</i> en la laguna de Rocha | 72 |
| Tabla 2.2. Porcentaje de lípidos y principales ácidos grasos de músculo dorsal con piel de <i>Paralichthys orbignyanus</i> y de sus presas potenciales en la Laguna de Rocha | 74 |
| Tabla 2.3. Porcentaje de cada ítem presa en la dieta de <i>Paralichthys orbignyanus</i> en la Laguna de Rocha utilizando el modelo QFASA | 77 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 Lugar de colecta de músculo con piel en <i>Paralichthys orbignyanus</i> | 13 |
| Figura 1.2. Diseño experimental de los ensayos de alimentación controlada | 14 |
| Figura 1.3. Biopsias musculares | 16 |
| Figura 1.4. Cromatografía de gases | 18 |
| Figura 1.5. Evolución del perfil de AG de lenguados alimentados con pejerrey | 35 |
| Figura 1.6. Evolución del perfil de AG de lenguados alimentados con lacha | 37 |
| Figura 1.7. Evolución de los SAFA, MUFA y PUFA del músculo con piel durante los ensayos de alimentación controlada | 39 |
| Figura 1.8. Evolución de los SAFA, MUFA y PUFA del hígado durante los ensayos de alimentación controlada | 45 |
| Figura 1.9. Coeficientes de calibración | 49 |
| Figura 1.10. Resultados gráficos del modelo tipo QFASA en Matlab 7.0 durante la fase de validación | 52 |
| Figura 2.1. Composición general de la dieta de 4 especies de peces planos piscívoros | 65 |
| Figura 2.2. Área de estudio (Laguna de Rocha) | 69 |
| Figura 2.3. Análisis de agrupamiento jerárquico de todas las presas potenciales de <i>Paralichthys orbignyanus</i> en la Laguna de Rocha | 76 |
| Figura 2.4. Estimación cuantitativa de la dieta de <i>Paralichthys orbignyanus</i> en la Laguna de Rocha utilizando QFASA | 78 |

Resumen

Las estimaciones precisas de la dieta de los predadores tope resultan insumos indispensables para comprender temas centrales en ecología como la estructura de las redes tróficas, las relaciones predador-presa y el comportamiento de forrajeo. La mayor parte de la información de la dieta de muchas especies está basada en el análisis del contenido estomacal, aunque comúnmente estas metodologías presentan grandes sesgos, sobreestimando presas con partes duras y subestimando o ignorando aquellas de cuerpo blando y rápida digestión. La especificidad biológica de los ácidos grasos sumado al hecho de que sean transferidos desde productores primarios hasta niveles tróficos superiores sin mayores alteraciones en su estructura molecular, hacen que estos compuestos puedan ser utilizados como marcadores tróficos. De esta forma del estudio del perfil de ácidos grasos en una red trófica se puede inferir cuantitativamente la dieta de un predador. El Análisis Cuantitativo del Perfil de Ácidos Grasos (QFASA por sus siglas en inglés) es una aproximación que opera generando estimaciones cuantitativas de dietas de predadores usando los perfiles de ácidos grasos (AG) de un predador y de sus presas potenciales. *Paralichthys orbignyanus* es un pez plano común de las costas uruguayas que, siguiendo la tendencia general de los lenguados, tiene un alto valor comercial en mercados nacionales e internacionales debido a la calidad de su carne. Esta especie realiza migraciones reproductivas, se mueve hacia el mar durante la temporada de desove y el resto del año se encuentra en zonas estuarinas como lagunas costeras y bocas de arroyos. Este lenguado ha sido propuesto como predador tope en la Laguna de Rocha, la cual a su vez está incluida dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas. Múltiples factores hacen que la Laguna de Rocha sea un sitio estratégico para realizar un estudio basado en ácidos grasos para determinar la dieta en esta especie. Es un cuerpo de agua muy estudiado y por ende se cuenta con mucha información acerca de la composición y biología de las especies de su red trófica. La dieta de *P. orbignyanus* ha sido evaluada a través de contenido estomacal en este sitio. A su vez esta laguna se conecta periódicamente con el mar por lo que puede considerarse un sistema semicerrado. El objetivo de este trabajo fue estimar la dieta de *Paralichthys orbignyanus* en la Laguna de Rocha mediante el análisis cuantitativo de los perfiles de ácidos grasos. Para implementar este tipo de modelos se necesita conocer la estrategia y los lugares de deposición de energía del predador, identificar un subconjunto de AG que refleje la dieta, contar con coeficientes de calibración (CC) para compensar las diferencias entre el perfil de AG del predador y sus presas debido al metabolismo lipídico del predador, programar un modelo de optimización matemático y contar con una base de datos de

los perfiles de AG del predador y sus presas potenciales en el lugar. El cálculo de los coeficientes de calibración conllevó una fase experimental en donde se alimentó a dos grupos de lenguados con pejerrey (*Odonthestes argentinensis*) y lacha (*Brevoortia aurea*). Esta etapa a su vez permitió validar el modelo en el laboratorio antes de extrapolarlo a la naturaleza. El tejido subcutáneo y el hígado constituyeron los lugares de reserva energética de *P. orbignyanus*. El subconjunto de ácidos grasos que mejor reflejó la dieta estuvo compuesto por 21 AG que representaban aproximadamente el 34% del área total de AG e incluyó casi exclusivamente AG dietarios. Durante el proceso de validación experimental del modelo se observó que los CC calculados con el grupo de lenguados alimentados con *O. argentinensis* mostraron mejores resultados que los obtenidos con el grupo alimentado con *B. aurea*. Aún así, el uso de CC para realizar la estimación cuantitativa en la Laguna de Rocha implicó una sobreestimación de *O. argentinensis*. Esto motivó que los resultados considerados como válidos sean aquellos en los cuales la estimación se realizó sin tomar en cuenta los CC, lo que a su vez fue posible ya que este modelo tiene suficiente robustez para aplicarse sin CC. *Paralichthys orbignyanus* se comportó como un piscívoro -durante la temporada de engorde- en la Laguna de Rocha, alimentándose principalmente de *O. argentinensis* (89,6%), otras dos especies de peces: *Jenynsia multidentata* (4,6%) y *Micropogonias furnieri* (0,7%) y una especie de crustáceo *N. americana* (5,1%). El abordaje con el análisis cuantitativo del perfil de ácidos grasos pudo ser utilizado en peces para estimar la dieta de *P. orbignyanus* en la Laguna de Rocha. Estos resultados estarían evidenciando la capacidad de los modelos que utilizan ácidos grasos, para detectar aquellas especies de cuerpo blando, difícil de identificar por contenidos estomacales.

Abstract

Accurate estimates of top predator diets are necessary to understand central themes in ecology as predator-prey relationships, structure of aquatic food webs and foraging behaviour. Most of the current knowledge about diet of many species arose from methods based on stomach contents. Despite of this, such information is usually biased, overestimating preys with hard body parts and underestimating or ignoring soft-bodied preys, in addition to providing only a snapshot of the most recent meal. The biological specificity of fatty acids plus the fact that they are usually transferred from primary producers to higher trophic levels without major changes in its molecular structure makes these compounds strategic in their use as trophic markers. In this way the study of fatty acid profiles in a food web could be led to infer quantitatively the diet of a predator. The Quantitatively Fatty Acids Signature Profile (QFASA) is a holistic approach that using predator fatty acids signatures along with a comprehensive database of the fatty acids signature of potential preys gives the quantitative contribution of each prey to the diet of the predator. *Paralichthys orbignyanus* is a common flatfish of the Uruguay shoreline, and in line with the trend of flatfish has a high market price owing to the quality of this meat. This species makes reproductive migrations: it goes to the sea during spawning season and in fatten stage it remains in the estuary. *P. orbignyanus* has been recognized as a top predator in Rocha Lagoon, an ecosystem which was included in the National System of Protected Areas. Rocha lagoon is a strategic site to conduct a study based on fatty acid to infer the diet of *P. orbignyanus*, because is a well-studied ecosystem where almost all components of the web food are recognized. In addition Rocha lagoon periodically connects to the sea, leading to be considered a semi-closed system. Added to this, the diet of *P. orbignyanus* has been evaluated in terms of stomach content in this site. The objective of this study was estimate the diet of *Paralichthys orbignyanus* in Rocha Lagoon by quantitative analysis of fatty acid profiles. To carry out such models is need: to know the strategy and sites of energy deposition of the predator; identify that subset of fatty acids which best reflects the consumed diet; having calibration coefficients (CC) to compensate for differences between the fatty acid profile of the predator and prey owing the lipid metabolism of predator; to program a mathematical model of optimization and have a database of fatty acid profiles of predator and all potential preys in Rocha lagoon. For obtaining the calibration coefficients was necessary an experimental study where two groups of flatfish were fed with silverside (*Odontesthes argentinensis*) and menhaden (*Brevoortia aurea*). This stage was also useful to validate the model into the laboratory prior to apply this model into nature.

Subcutaneous tissue and liver were the sites identified as energy reservoirs of *P. orbignyanus* in this study. The subset of fatty acid that better reflected the consumed diet consisted of 21 fatty acids representing approximately 34% of total area of fatty acids and included almost exclusively dietary fatty acids. During experimental validation of the model it was observed that estimations of diet with CC calculated with the flatfish fed on *O. argentinensis* were better than the results based on the group fed on *B. aurea*. Even so, the use of CC in a quantitative estimation of the diet of *P. orbignyanus* in Rocha lagoon involved an overestimation of the prey used in the experimental study (*O. argentinensis*). This led to consider valid results those calculated without CC, which was possible owing to this kind of models are robust enough to be applied without considering CC. *Paralichthys orbignyanus* can be considered as a piscivorous flatfish during fatten stage in Rocha lagoon. It feeds mainly on *O. argentinensis* (89,6%), other two fish species: *Jenynsia multidentata* (4,6%) and *Micropogonias furnieri* (0,7%) and one species of crustacean: *N. americana* (5,1%). The approach with quantitative analysis of fatty acid profile in fish could be used to estimate the diet of *P. orbignyanus* in Rocha Lagoon. These results are demonstrating the ability of such models that use fatty acids to detect thos soft-bodies species, difficult to identiy by means of stomach contents.

Introducción General

Los lenguados

La familia Paralichthyidae está representada por 11 géneros y 94 especies. En el Océano Atlántico existen 9 géneros que habitan desde el Golfo de Maine (Bigelow & Schroeder, 1953) hasta el sur de Argentina (Díaz de Astarloa & Munroe, 1998). El género *Paralichthys* contiene 18 especies (Froese & Pauli, 2015) se encuentra representado en todos los océanos y 9 de sus especies son o están siendo consideradas como candidatas para la acuicultura (Robaldo, 2003).

En Uruguay se han reportado tres especies del género *Paralichthys*: *P. orbignyanus* (Valenciennes, 1842); *P. isosceles* (Jordan, 1891); y *P. patagonicus* (Jordan, 1889) (Haimovici *et al.*, 1996; Nión *et al.*, 2002). Estas especies se distribuyen desde los 34° N y 47° S de la plataforma continental de América del Sur (Díaz de Astarloa & Munroe, 1998). *Paralichthys orbignyanus* es un lenguado común en las costas uruguayas, que se distribuye desde Río de Janeiro (22°S) en Brasil hasta el Golfo de San Matías en Argentina (41°S) (Fabré & Díaz de Astarloa, 1996). Es un pez plano marino que siguiendo la tendencia general de los lenguados, tiene un alto valor comercial en mercados nacionales e internacionales debido a la calidad de su carne (Sampaio *et al.*, 2001). Este lenguado alcanza un gran porte, llegando a 100 cm de longitud total y más de 10 kg de peso.

Es un lenguado eurihalino que habita a profundidades no mayores a 30 m (Lopez Cazorla, 2005) y que se distingue de las otras dos especies del mismo género que habitan nuestras aguas, por adentrarse en el estuario y en las lagunas costeras que se comunican con el mar (Vaz Ferreira, 1969). El hecho de que sus juveniles y subadultos sean habitantes comunes de los estuarios ha llevado a algunos autores a considerarla una especie estuarina-dependiente (Chao *et al.*, 1982; Carneiro, 1995).

P. orbignyanus es una especie cuyo estudio reviste particular interés por diversas razones que van desde sus características particulares desde el punto de vista fisiológico (Sargent *et al.*, 2002), su importancia comercial tanto en las pesquerías como para el desarrollo de la acuicultura (Sampaio *et al.*, 2001), hasta por el rol crucial que juega como predador tope en las lagunas costeras (Rodríguez-Graña *et al.*, 2008), con énfasis en la Laguna de Rocha por la importancia que se le ha dado al sistema como unidad de conservación.

Desde el punto de vista fisiológico y metabólico en particular, entre los peces planos marinos, dentro del género *Paralichthys* se ha encontrado una especie que es capaz de producir ácidos grasos altamente insaturados de la serie n-3. Los ácidos grasos son biomoléculas lipídicas formadas por cadenas hidrocarbonadas con número variable de átomos de carbono que presentan en su extremo un grupo carboxilo. Dependiendo del grupo zoológico, existen ácidos grasos que son sintetizados y otros que debido a la imposibilidad de producirlos deben ser directamente consumidos en la dieta (esenciales). Estos compuestos presentan funciones energéticas, estructurales y reguladoras. Los peces dulceacuícolas mediante elongaciones y desaturaciones a partir del ácido linolénico son capaces de producir ácidos grasos altamente insaturados de la serie n-3, algo que no ocurre en la mayoría de los peces marinos y por ende resultan ácidos grasos esenciales para este grupo. Excepcionalmente se ha observado una especie marina del género *Paralichthys* que aún es capaz de producir ácidos grasos altamente insaturados a partir de sus precursores de cadena corta (Sargent *et al.*, 2002).

Con respecto a la evaluación de *P. orbignyanus* como especie candidata para la acuicultura se han realizado diversos estudios. Se ha trabajado sobre la tolerancia a bajos niveles de salinidad (Wasielesky *et al.*, 1995; Sampaio *et al.*, 2007) debido a que este lenguado es un habitante común de ambientes estuarinos y por ende es resistente a las variaciones ambientales que tienen lugar en estos ecosistemas. Se ha evaluado la tolerancia a compuestos nitrogenados (Bianchini *et al.*, 1996) y al estrés ácido (Wasielesky *et al.*, 1997). También se han realizado estudios sobre la influencia de la salinidad sobre el metabolismo, crecimiento y osmoregulación (Sampaio *et al.*, 2001; Sampaio & Bianchini, 2002), infección parasitaria (Robaldo *et al.*, 2002), y estrés producido por las prácticas en acuicultura (Bolasina, 2011).

Dentro del área reproductiva se ha avanzado respecto a la reproducción en la naturaleza (Carneiro, 1995; Haimovici *et al.*, 1996, Robaldo, 2003; Radonic, 2011) y en cautividad (Robaldo, 2003; Bianchini *et al.*, 2005; Radonic, 2011). Se han realizado estudios sobre la inducción en el desove (Cerqueira *et al.*, 1997; Radonic *et al.*, 2007; Sampaio *et al.*, 2008), desove natural y larvicultura en laboratorio (Sampaio *et al.*, 2008). Se han caracterizado las góndadas femeninas desde el punto de vista histológico (Féola, 2009) y bioquímico (Gadea, 2011). Se ha abordado la morfología de sus huevos (Mellito da Silveira *et al.*, 1995, Cerqueira, 2005) y sus larvas (Kinoshita *et al.*, 2009). *P. orbignyanus* es un desovante parcial cuya estación reproductiva se extiende desde Octubre hasta Abril (Mellito da Silveira *et al.*, 1995; Robaldo, 2003). Al

igual que otros lenguados del Atlántico Sur desova en aguas marinas, pero sus juveniles migran hacia las lagunas costeras (Bergman *et al.*, 1988; Koutsikopoulos & Lacroix, 1992; Whitfield, 1998). Fuera de temporada de desove este lenguado es encontrado principalmente en lagunas costeras y desembocadura de arroyos, lo que hace suponer que estos lugares no sólo constituirían áreas nursery para los juveniles, sino áreas de alimentación para los adultos (Radonic, 2011). Al estudiar la maduración gonadal de esta especie en las lagunas y en el mar, mediante el balance de ácidos grasos entre la gónada (femenina) y el músculo a lo largo de un ciclo reproductivo, se observó que si bien las lagunas costeras constituyen áreas de alimentación para los adultos, éstas cubrirían las necesidades nutricionales cuantitativas y no cualitativas (Magnone *et al.*, 2009).

Abordaje del análisis cuantitativo del perfil de ácidos grasos

Las estimaciones precisas de dietas en predadores tope dentro de un ecosistema resultan insumos indispensables para comprender temas centrales en ecología como la estructura de las redes tróficas, las relaciones predador-presa y el comportamiento de forrajeo (Schoener, 1971; Paine, 1980; Stephens & Krebs, 1986; Pimm *et al.*, 1991; Sih *et al.*, 1998). El rol que juegan los predadores tope dentro de los ecosistemas, es muy importante en la determinación de la estructura y funcionamiento de los mismos (Katona & Whitehead, 1988; Bowen, 1997).

Existen importantes antecedentes sobre el conocimiento de alimentación de este lenguado basados en el análisis de contenido estomacal (Norbis & Galli, 2004; Carnikián, 2006). A pesar de que el conocimiento actual sobre dieta de muchas especies deriva de estos métodos convencionales, las estimaciones que surgen de ellos son generalmente sesgadas (Jobling & Breiby, 1986). Esto es debido a que la mayoría de presas de cuerpo blando tienen una rápida digestión, por lo que resultan difíciles de identificar, algunas partes duras pueden no ser consumidas o directamente pueden desgastarse durante la digestión lo que conduce a una subestimación de la presa o la identificación no puede ser posible. Más aún el grado de desgaste es especie-específica y a menudo es una función del tamaño de la presa (Bowen, 2000). Por lo que las tasas diferenciales de digestión pueden sesgar la estimación a favor de especies con partes duras mayores. Por último este tipo de metodología puede brindar sólo información acerca de la última ingesta o presas consumidas recientemente (Iverson *et al.*, 2004).

Las limitaciones que surgen en las estimaciones de las dietas, han llevado al desarrollo de otras técnicas, entre ellas los isótopos estables (de carbono y nitrógeno) (Alfaro et al., 2006; Botto et al., 2011; Neubauer & Jensen 2015) y otras que abordan el tema de alimentación de una especie mediante el uso de marcadores lipídicos o el perfil característico de ácidos grasos (Petersen et al., 2002; Iverson et al., 2004; Alfaro et al., 2006; Budge et al., 2006; Rossi et al., 2006). Los ácidos grasos son importantes debido a que constituyen una fuente energética, son nutrientes esenciales para el crecimiento y la sobrevivencia y son componentes estructurales y funcionales de las membranas celulares (Sargent et al., 2002). Su especificidad biológica y el hecho de que sean transferidos desde los productores primarios hasta niveles tróficos superiores sin mayores alteraciones en su estructura molecular, hacen que los ácidos grasos pueden ser utilizados como biomarcadores (Parrish et al., 2000).

Laguna de Rocha

En particular en la Laguna de Rocha recientemente se ha llevado a cabo un trabajo usando la técnica de isótopos estables, en donde se propone un listado de presas potenciales para *P. orbignyanus* (Rodríguez-Graña et al., 2008), ubicando a este lenguado como uno de los predadores tope del sistema. Cabe destacar que esta técnica es útil para inferir el nivel trófico de la especie en una trama trófica pero no sirve para estimar la composición específica cuantitativa de su dieta (Hobson, 1993; Koch et al., 1995).

Múltiples factores hacen que la Laguna de Rocha sea un sitio estratégico para realizar un estudio basado en ácidos grasos para determinar la dieta en esta especie. Es un cuerpo de agua en donde se han focalizado muchos trabajos, por lo cual casi todas las especies que allí viven son conocidas, además de haberse realizado un estudio de la dieta de este Lenguado por contenido estomacal (Norbis & Galli, 2004). Ha sido estudiada desde distintos enfoques que van desde planes de manejo (Santana & Fabiano, 2001; Vitancurt & Olazabal, 2002), biología de sus especies (Jorcín, 1996; Norbis 2000; Conde et al., 2002; Olsson et al., 2003; Bonilla et al., 2005; Giménez et al., 2006), relaciones y niveles tróficos (Rodríguez-Graña et al., 2008, Milessi et al., 2010), calidad de agua (Arocena et al., 1996) hasta aspectos sociales e impacto ambiental (Vitancurt & Fagetti, 1995). Es una laguna somera y salobre que se conecta periódicamente con el mar (por lo que puede considerarse un sistema semicerrado), que durante la intrusión marina genera un fuerte gradiente salino (Pintos et al., 1991; Conde et al., 1999, 2000). Esta laguna, como otras en Uruguay son áreas de alimentación de aves migratorias y ha sido declarada área protegida por normativas

nacionales y convenciones internacionales (Ramsar y MaB-UNESCO). Actualmente está incluida dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas, constituyendo una reserva de la biosfera.

Considerando los sesgos en la estimación de la dieta a partir de la técnica tradicional de contenido estomacal y teniendo en cuenta las características de la Laguna de Rocha, este sitio resulta idóneo para realizar una estimación cuantitativa de la dieta de *Paralichthys orbignyanus* mediante abordajes que utilicen ácidos grasos. La transferencia de lípidos como marcadores tróficos en redes tróficas acuáticas -ya sea en su base como en niveles tróficos superiores- ha sido ampliamente documentada desde la década del 30 (revisado en Dalsgaard *et al.*, 2003). Cabe destacar que al principio sólo se estudiaba la transferencia de ácidos grasos entre niveles tróficos cercanos. Más tarde, los enfoques se fueron complejizando y los ácidos grasos fueron empleados en forma cualitativa o semicuantitativa para caracterizar aspectos más amplios de la tramas tróficas. Recientemente se ha avanzado aún más, llegando incluso a estimar cuantitativamente la dieta de ciertos mamíferos que se encuentran en los niveles más altos de las cadenas tróficas polares a través análisis cuantitativo del perfil de ácidos grasos (QFASA, por sus siglas en inglés) (Iverson, *et al.*, 2004).

Modelos tipo QFASA

Los modelos de tipo QFASA están basados en el principio de que los organismos presentan un perfil de ácidos grasos característico, y que éstos son asimilados por el predador de una forma previsible. Propone pues el desarrollo de un modelo, que por medio de una minimización matemática entre los perfiles de ácidos grasos de las presas y el predador se puede llegar a estimar cuantitativamente qué fue consumido por el predador (Budge *et al.*, 2006). Para corregir el sesgo que se genera por efecto del metabolismo del predador, se deben previamente obtener coeficientes de calibración por medio de ensayos de alimentación controlada a largo plazo (Iverson *et al.*, 2004). Pues aún en predadores que consumen dietas con altos contenidos lipídicos, la deposición de AG en sus tejidos nunca igualará exactamente la de sus presas, respondiendo muchas al estado de los individuos (reproducción, migración, engorde, etc.) o fundamentalmente a la fisiología característica de la especie (Budge, 2006; Iverson, 2009; Thiemann *et al.*, 2008). Para dar cuenta de estos procesos, es que se han desarrollado los coeficientes de calibración. Luego de obtenidos estos coeficientes y de haber identificado el lugar de reserva energética del predador, se corrige el perfil de AG. Lo que sigue es una optimización-minimización utilizando la distancia Kulback-Liebler, entre el perfil de AG promedio del predador y todos los

perfíles de AG de las presas potenciales, capturando así la variabilidad de las presas. Por último y para estimar la proporción de cada especie presa en la dieta del predador se hace una corrección con respecto al contenido lipídico de cada una de las presas (Iverson *et al.*, 2004)

Hasta el momento, este abordaje se ha aplicado en aves marinas (Iverson *et al.*, 2007; Wang, *et al.*, 2010), pinnípedos (Beck *et al.*, 2007; Nordstrom *et al.*, 2008; Tucker *et al.*, 2009; Meynier *et al.*, 2010; Bromaghin *et al.*, 2013) y osos polares (Iverson *et al.*, 2004; Thiemann *et al.*, 2008). En peces en particular, se ha avanzado en la construcción de coeficientes de calibración (Budge *et al.*, 2012).

Un modelo estadístico-matemático tipo QFASA puede ser útil para discernir aspectos tróficos de *P. orbignyanus* en la Laguna de Rocha, debido fundamentalmente a dos aspectos: desde el punto de vista de la especie este lenguado es un predador tope dentro del ecosistema (Rodríguez-Graña *et al.*, 2008; Milessi *et al.*, 2010) y entra a estos cuerpos de agua a alimentarse fuera de la temporada de desove (Radonic, 2011), desde el punto de vista ambiental, la laguna de Rocha constituye un lugar semicerrado y se conocen casi todas las especies que componen la red trófica de la misma por ser un lugar diana de numerosos trabajos. Dadas estas condiciones, resulta plausible poder extrapolar un modelo desarrollado en principio para vertebrados endotermos a vertebrados ectotermos, en este caso a peces.

La hipótesis de este trabajo supone que el perfil de ácidos grasos de los lugares de reserva de *Paralichthys orbignyanus* y de sus presas potenciales en la Laguna de Rocha permite estimar cuantitativamente su dieta.

El objetivo general de este trabajo fue estimar la dieta de *Paralichthys orbignyanus* en la Laguna de Rocha mediante el análisis cuantitativo de los perfíles de ácidos grasos (QFASA).

Los objetivos específicos fueron abordados en dos capítulos. En la primera instancia experimental validar el modelo en el laboratorio y obtener los coeficientes de calibración (Capítulo 1), y finalmente adaptar y aplicar el modelo para *Paralichthys orbignyanus* en la naturaleza (Capítulo 2).

Capítulo 1.

Experiencias de calibración y validación de un modelo tipo QFASA

1.1 Introducción

1.1.1 Coeficientes de calibración (CC)

Los coeficientes de calibración constituyen un requisito previo y crucial a la hora de poner en práctica un modelo tipo QFASA. Los ácidos grasos son incorporados en los tejidos de reserva de un organismo en proporciones diferentes a las consumidas debido a distintos procesos bioquímicos que incluyen movilización selectiva, catabolismo a través de β -oxidación y biosíntesis. Estos coeficientes dan cuenta del metabolismo lipídico del predador y su cálculo sirve para compensar estas diferencias (Iverson *et al.*, 2004). A su vez, la obtención de los mismos es difícil ya que se necesitan experimentos de dieta controlada, manteniendo animales vivos en cautividad por largos períodos de tiempo.

Para calcular coeficientes de calibración, se parte de la premisa de que si un predador ha consumido una dieta constante por un largo período de tiempo, el perfil de ácidos grasos de sus reservas lipídicas constituirá el reflejo máximo de la dieta consumida y las diferencias encontradas entre su perfil de ácidos grasos y el de su dieta se atribuirán al proceso metabólico de deposición de los ácidos grasos individuales de ese predador. De esta forma, los coeficientes de calibración son simplemente la razón entre los ácidos grasos del predador y los de la dieta proporcionada (Iverson, 2004).

También se ha observado que aunque el patrón de deposición de lípidos haya sido bien estudiado para algunas especies (Iverson *et al.*, 2004; Iverson *et al.*, 2007; Nordstrom *et al.*, 2008; Rosen & Tollit 2012), los coeficientes de calibración para cada ácido graso dependerán del taxón y no pueden ser extrapolados entre especies aún emparentadas (Rosen & Tollit 2012). Esto tiene implicancias directas a la hora de poder aplicar este método en especies o géneros para los cuales existan coeficientes de calibración disponibles.

El tiempo necesario para que se alcance el máximo nivel de reflejo entre el perfil de ácidos grasos de la dieta consumida y el tejido de reserva del predador, constituye otro factor importante en este abordaje (Budge *et al.*, 2011). La vasta literatura en acuicultura ofrece información acerca de este tema. Por ejemplo Bell *et al.*, (2003) y

Jobling (2003) sugieren que es necesario un tiempo de entre 14 a 25 semanas para que estabilice el perfil de ácidos grasos en los tejidos del salmón. Sin embargo otros investigadores trabajando con salmonidos y bacalao establecen que luego de 2 a 12 semanas de alimentación, el perfil de ácidos grasos del tejido de almacenamiento de estos peces se estabiliza (Skonber *et al.*, 1994; Kirsch *et al.*, 1998; Copeman *et al.*, 2013).

Debido a la especificidad de los coeficientes de calibración, sumado al hecho de que existen pocos trabajos de esta temática específica en peces (Budge *et al.*, 2011; Copeman *et al.*, 2013) resultó necesaria la implementación de experiencias de alimentación controlada en *Paralichthys orbignyanus*. La elección del tejido diana para el estudio, o el tejido donde activamente está haciendo las reservas lipídicas una especie resulta fundamental en este paso (Budge *et al.*, 2006).

1.1.2 Reservas lipídicas

Los peces, a diferencia de los mamíferos que depositan su grasa en un órgano principal especializado, almacenan su reservas lipídicas en diferentes lugares del cuerpo como el hígado, la grasa perivisceral, el músculo y la grasa subcutánea (Sheridan, 1988; Ando *et al.*, 1993). A su vez esta deposición no es pareja entre estos órganos y dependerá según el autor del estilo de vida (Braekken, 1959) o de su taxonomía (Vinogradov, 1985).

Braekken (1959) establece que el hígado es el lugar de reserva en peces bentónicos y lentos, mientras que el músculo esquelético tiene mayor preponderancia como lugar de reserva en aquellas especies más activas. Si bien esta correlación ecológica es válida para muchas especies (Sheridan, 1988; Jobling *et al.*, 2002; Nanton *et al.*, 2003; Nanton *et al.*, 2007), resulta confusa y contradictoria para muchas otras.

Por otra parte otros autores consideran la familia Pleuronectidae, Cyprinidae y Clupeidae como especies que acumulan lípidos en el tejido subcutáneo y en el músculo (Podrazhanskaya & Yarzhombek, 1970; Shevchenko, 1971; Henderson & Tocher, 1987). Además Sheridan (1994), establece que los peces magros almacenan sus reservas lipídicas en el hígado. *Paralichthys orbignyanus* es categorizado como un pez magro. (% Lípidos <2% peso seco).

En este escenario resulta difícil establecer *a priori* cuál es el lugar de reservorio de lípidos en este lenguado. Por esta razón y debido al hecho de que los peces se enfrentan a la necesidad de movilizar sus reservas energéticas durante la reproducción, observar la evolución estacional del factor de condición, índice hepatosomático e índice gonadosomático resulta un buen abordaje para dilucidar la estrategia de deposición de reservas energéticas. Las fluctuaciones en el metabolismo energético se encuentran parcialmente representadas por las variaciones en estos índices.

El factor de condición (K) o índice de Fulton da cuenta de la relación entre el peso y la longitud del animal, proporciona un índice a menudo utilizado para cuantificar el estado de salud de los peces, pudiendo asociarse al estado de delgadez o gordura de los mismos (Ricker, 1975). El índice hepatosomático (IHS) es otro de los índices utilizados para evaluar las modificaciones de las reservas energéticas a lo largo de un ciclo gonadal (Love, 1970). El índice gonadosomático (IGS) expresa el peso de la gónada como un porcentaje del peso total del pez.

A su vez las variaciones estacionales de macronutrientes como los lípidos, representan la incorporación y acumulación de reservas en las fases pre-reproductivas en contraposición a los niveles más bajos durante la temporada de desove (Sargent, 1995).

1.1.3 Ácidos grasos dietarios

Los ácidos grasos son usualmente denominados con una notación abreviada A:Bn-x, donde A indica el número de átomos de carbono, B el número de dobles enlaces y x la posición del primer doble enlace en relación al grupo metílico terminal.

A pesar de que según la técnica utilizada se pueden llegar a reconocer más de 70 ácidos grasos, no todos ellos aportan la misma información acerca de la dieta (Iverson, 1993). Dentro de los animales, y dependiendo del taxón, habrá algunos AG que se pueden producir (endógenos) y algunos que se tienen que ingerir (ácidos grasos dietarios). Serán entonces éstos los que aporten información acerca de la dieta consumida.

Los ácidos grasos fundamentales para el crecimiento y la supervivencia, por ser componentes estructurales de las membranas además de fuente energética, adquieren carácter de esencialidad en la medida en que la síntesis de algunos de ellos está limitada a los productores primarios (Sargent *et al.*, 2002).

Los ácidos grasos esenciales (AGE) no pueden ser sintetizados *de novo* por los peces (Mead & Kayama, 1967), éstos deben ser consumidos preformados, o en forma de precursores menos insaturados en la dieta. En general, los peces de agua dulce, que satisfacen sus requerimientos de ácidos grasos esenciales con ácido linoleico (18:2n6) y/o ácido linolénico (18:3n3) son capaces de elongar y desaturar éstos ácidos grasos para formar ácido araquidónico (20:4n6, AA), ácido eicosapentanoico (20:5n3, EPA) y ácido docosahexanoico (22:6n3, DHA). Los peces marinos en general presentan una escasa capacidad para sintetizar ácidos grasos altamente insaturados de la serie n-3 (n-3 HUFA) a partir del 18:3n3 (Cowey *et al.*, 1976). *Paralichthys orbignyanus* es un pez estuarino dependiente, en cuyo género se incluye uno de los casos excepcionales en donde se ha visto que un pez marino tiene la capacidad de producir n-3 HUFA a partir de 18:3n3 (Sargent *et al.*, 2002).

Aún así los ácidos grasos dietarios, también pueden sufrir modificaciones y serán los coeficientes de calibración los que den cuenta de esos procesos y el mecanismo por el cual se pueda corregir ese efecto (Iverson, *et al.*, 2004). De esta forma, será el conjunto de AG seleccionados a ser incluidos en los análisis estadísticos para estimar la dieta, el que tenga gran influencia en la precisión de dicha estimación (Iverson *et al.*, 2004; Nordstrom *et al.*, 2008; Meynier *et al.*, 2010).

1.1.4. Objetivos específicos

Para poder cumplir con todos los requisitos propuestos para la aplicación de un modelo tipo QFASA, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Dilucidar en qué lugar/es está depositando las reservas energéticas el lenguado *Paralichthys orbignyanus*, e identificar en caso de que sea más de uno, cuál es que el mejor refleja el perfil de ácidos grasos de la dieta
- ✓ Establecer el tiempo necesario para que estabilice el perfil de ácidos grasos entre la dieta consumida y el tejido de reserva de *Paralichthys orbignyanus*

- ✓ Obtener los coeficientes de calibración por medio de experimentos de alimentación controlada para esta especie
- ✓ Establecer qué subconjunto de ácidos grasos es el que mejor refleja la dieta consumida durante los ensayos de alimentación controlada
- ✓ Validar el modelo experimentalmente

1.2 Materiales y Métodos

1.2.1 Muestreo de *Paralichthys orbignyanus* en la naturaleza

Los ejemplares de *P. orbignyanus* fueron obtenidos de la Laguna de Rocha, Arroyo Valizas y Océano Atlántico. Los muestreos tuvieron lugar desde Abril de 2008 a Octubre de 2010. En el caso de la captura en la Laguna de Rocha, los lenguados eran capturados por medio de redes de calada por los pescadores de la zona, se trabajó con la ayuda de ellos, coordinando los momentos en que procesaban los lenguados. En el caso del arroyo Valizas se utilizaron redes de calada, de malla 22 (11 cm entre nudos), calados al anochecer y levantados por la mañana (los peces quedan enmallados por las agallas). En el caso de los lenguados capturados en el mar, fueron pescadores del lugar los que aportaron los especímenes pescados a caña. Todos los individuos fueron pesados, medidos, sexados y se colectó el hígado, un trozo de músculo dorsal con piel y las gónadas, que fueron pesados y conservados en freezer a -20°C hasta su análisis en el laboratorio.

1.2.2 Índices

Se calculó el factor de condición (K), el índice hepatosomático (IHS) y el índice gonadosomático (IGS) calculados como:

K = (P x 100)/ LT³; siendo LT: Longitud total expresada en cm y P: Peso expresado en gramos

IHS = (P_{híg} / P_{tot})*100; siendo P_{híg} = Peso del hígado expresado en gramos y P_{tot}= Peso total del individuo expresado en gramos

IGS = (P_{gón} / P_{tot})*100; siendo P_{gón} = Peso de ambas gónadas expresado en gramos y P_{tot}= Peso total del individuo expresado en gramos

1.2.3 Análisis estadísticos

Se realizaron análisis de Varianza de una sola vía (ANOVA) para cada índice entre estaciones para observar variaciones mensuales. Si se encontraban diferencias significativas se realizó un análisis post-hoc (Tukey-Kramer) para observar qué grupos diferían entre sí. Previamente, se verificó la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianza mediante el test de Bartlett. Los análisis se efectuaron el programa GraphPad InStat.

1.2.4 Diseño experimental y obtención de ejemplares de *Paralichthys orbignyanus* para los experimentos de alimentación controlada

En diciembre de 2009 fueron pescados 23 lenguados en la Laguna de Rocha utilizando redes de calada. Los peces fueron transportados en tanques cerrados llenos de agua hasta la tapa (para impedir que ésta salte y se golpeen) y con abundante aireación hasta la Estación Experimental de Investigaciones y Acuicultura de la DINARA en Cabo Polonio. Ya en las instalaciones los peces fueron sometidos a un baño de formol (100 ppm) durante una hora para deshacerse de los parásitos externos. Los animales fueron medidos y pesados. De este lote, 6 fueron sacrificados por sobredosis de anestésico (benzocaína) para poder establecer las condiciones bioquímicas iniciales (porcentaje de lípidos y composición de ácidos grasos). Se colectó hígado, góndadas y músculo con piel (siempre del mismo lugar, superior dorsal, Fig. 1.1).

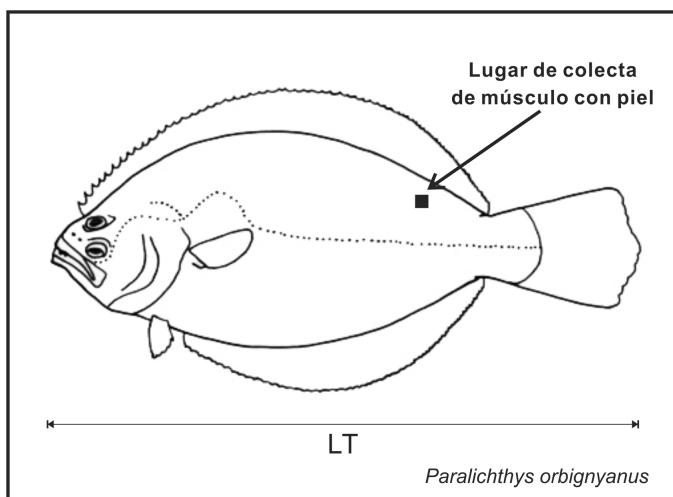


Figura 1.1 Lugar de colecta de músculo con piel (dorsal) en todos los lenguados utilizados en este estudio.

Los 17 lenguados restantes fueron aclimatados en la estación experimental, durante aproximadamente 3 meses, en los cuales se habituaron a la vida en cautividad y aceptaron comida. Un mes antes de que comenzara el experimento de alimentación controlada, los individuos fueron separados en dos tanques de 2000 L con circulación abierta. Se midió pero no se controló el fotoperiodo ni la temperatura del agua.

En abril de 2010 (fuera de temporada reproductiva) comenzaron los experimentos de alimentación controlada. Se comenzó justamente aquí debido a que el tenor lipídico de los diferentes reservorios energéticos en peces se encuentran sujetos a variaciones provocadas por factores biológicos y ambientales: edad, sexo, alimentación, estado

reproductivo, estación del año. En particular durante la maduración gonadal y el desove ocurren importantes movilizaciones de las reservas corporales (Luquet & Watanabe, 1986). Por este motivo, para atenuar las variaciones en lípidos y ácidos grasos se eligió trabajar con ejemplares fuera de la temporada reproductiva.

Cada grupo de lenguados fue alimentado diariamente y por la mañana a saciedad durante todo el experimento con pejerrey (*Odontesthes argentinensis*) o lacha (*Brevoortia aurea*), provenientes de una sola pesca en la Laguna de Rocha.

Para observar la evolución del tenor lipídico y la composición de ácidos grasos en el músculo con piel se realizaron 3 biopsias musculares (sobre el mismo individuo) en lenguados vivos en la semana 5, 12 y 20, en los dos tratamientos (Fig. 1.2). En el último muestreo (semana 20) fueron sacrificados 6 individuos por tratamiento para poder colectar el hígado. En todas las instancias de colecta de tejidos, los individuos fueron pesados y medidos.

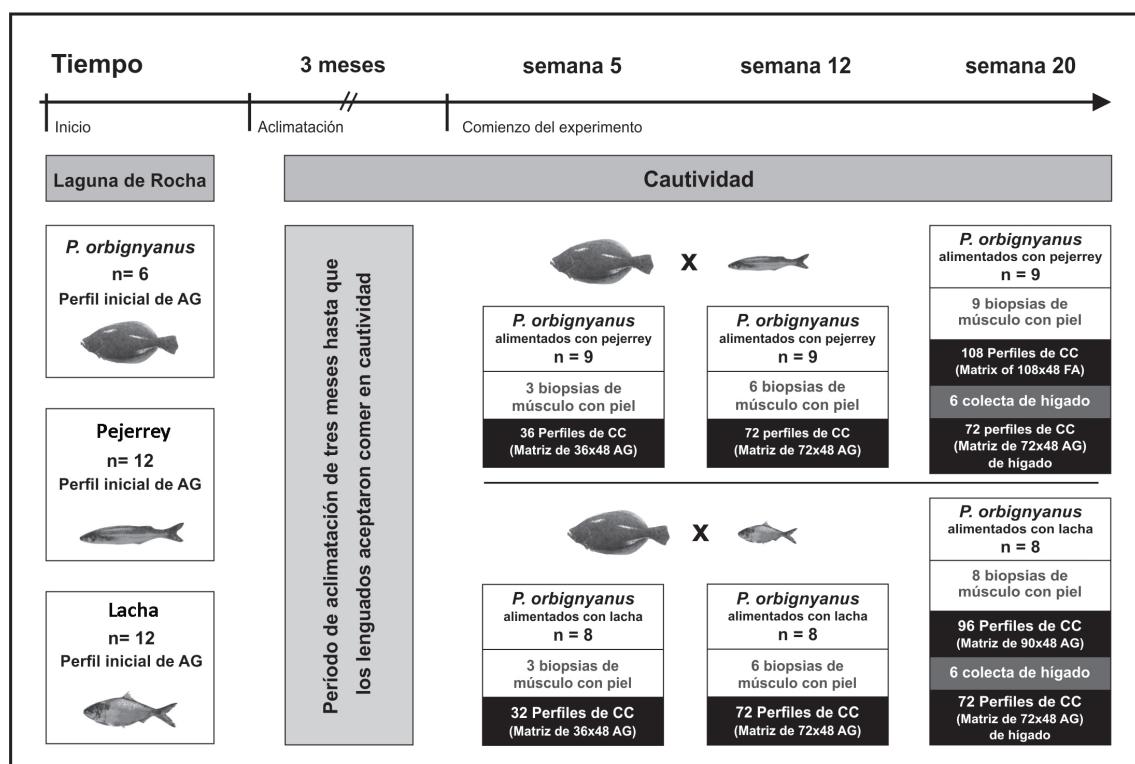


Figura 1.2. Esquematización del diseño experimental utilizado en los experimentos de alimentación controlada para obtener coeficientes de calibración y validar el modelo bajo condiciones experimentales.

1.2.5 Ítems presa de los experimentos de alimentación controlada

Los lenguados del ensayo de alimentación controlada fueron alimentados con dos especies de peces: Pejerrey (*Odontesthes argentinensis*) y Lacha: (*Brevoortia aurea*).

Estos peces fueron pescados y comprados en la laguna de Rocha en abril de 2010 a los pescadores. Para minimizar la variación en la composición de ácidos grasos de las presas, las mismas fueron colectadas de un único lote, evisceradas y mantenidas congeladas durante todo el experimento, a excepción de la cantidad diaria que era descongelada unas horas antes para que alcanzara la temperatura ambiente.

Los pejerreyes y las lachas fueron ofrecidas como filetes a los lenguados de los dos tratamientos. A su vez, 12 de estos filetes de cada especie fueron seleccionados al azar con el objeto de analizar el porcentaje de lípidos y la composición de ácidos grasos, para el subsiguiente cálculo de coeficientes de calibración.

1.2.6 Biopsias musculares en lenguados vivos y colecta de hígado

Para este experimento se diseñó un protocolo para extraer un trozo de músculo con piel en los lenguados vivos (biopsia muscular) con el fin de poder evaluar la evolución del perfil de ácidos grasos en un eje temporal y poder establecer el tiempo que lleva la estabilización en el perfil de ácidos grasos del músculo con piel de los lenguados. El protocolo de las biopsias musculares en lenguados vivos fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Estas biopsias musculares se realizaron en 3 instancias (semana 5, 12 y 20). En la semana 5 se realizaron 3 biopsias en cada tanque. En la semana 12 se realizaron 6 biopsias en cada tanque. En la semana 20 se realizaron 2 biopsias en el grupo alimentado con lacha y 3 biopsias en el grupo alimentado con pejerrey y los restantes lenguados de cada grupo (6) fueron sacrificados, colectándose el hígado y también músculo con piel (Fig. 1.2). Todas las muestras colectadas fueron lavadas con agua destilada, identificadas y congeladas a -20°C hasta el momento de los análisis bioquímicos.

Durante las biopsias los animales eran anestesiados (5 minutos con 0,001g/l de benzocaína). Luego se extraía un trozo de aproximadamente 0,7x0,7x0,7 cm de músculo dorsal con piel con bisturí. Luego se cauterizaba y se agregaba propóleo en la zona afectada. Desde una día antes y por siete días luego de la biopsia los lenguados eran tratados con antibiótico (0,02 g/l oxitetraciclina) para prevenir infecciones. Protocolo en Anexo.

En la semana 20, de los 12 lenguados sacrificados, además de colectar el hígado se colectó un trozo de 0,7x0,7x0,7 cm de músculo con piel y otro mayor para determinar si los trozos pequeños obtenidos en las biopsias anteriores eran representativos del perfil de AG del músculo.



Figura 1.3. Biopsias musculares en individuos vivos. a) Extrayendo músculo con piel, b) Individuo biopsiado 2 veces en donde se observa la biopsia anterior cicatrizada, c) tanque 2000 L con lenguados del experimento de alimentación controlada.

1.2.7 Análisis bioquímicos y cromatografía de gases

Los análisis bioquímicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Recursos Naturales de Facultad de Ciencias. Se analizaron todas las muestras de lenguados de músculo con piel (43) e hígado (12) por separado. Se analizaron 12 muestras de pejerrey y 12 de lacha. Se hicieron análisis de humedad, lípidos totales y composición de ácidos grasos de lípidos totales.

- *Humedad*

Se determinó la humedad según el protocolo A.O.A.C 1980 en todos aquellos casos en los que la muestra fue lo suficiente grande. Este método consiste en secar la muestra (previamente pesada a temperatura ambiente) en estufa a 110°C por 24 horas hasta que el peso sea constante según la fórmula:

$$\% \text{ H} = (P_i - P_f) \times 100 / P_i;$$

siendo P_i el peso inicial y P_f el peso final

- *Lípidos totales*

La extracción de lípidos se realizó según la técnica de Folch *et al.*, (1957). A las muestras previamente liofilizadas y homogenizadas se les agregó 4 ml de cloroformo:metanol (2:1, v/v) y se llevaron al homogeneizador durante 5 minutos. Luego se filtró la solución y se trasvasó a un tubo con 16 ml de cloroformo:metanol (2:1) utilizados para enjuagar el material que había estado en contacto con la muestra. Luego se agregó una solución de NaCl (7,3 gr/L) y se centrifugó durante 20 minutos a 2000 rpm. Luego se recuperó la fase orgánica en un matraz y se evaporó el cloroformo en un rotavapor a 39°C. Despues se traspasaron los lípidos del matraz a un tubo con 1 ml de cloroformo y se enjuagó 3 veces más. La evaporación aquí se

completó con una corriente de nitrógeno y se dejó secar en un desecador con sílica-gel durante 24 horas. El contenido de lípidos totales de la muestra se determinó por gravimetría (0.0001g). En todos los casos que fue posible el análisis se realizó por duplicado. Los lípidos extraídos se guardaron diluidos en cloroformo y en atmósfera de nitrógeno libre de oxígeno en los mismos tubos, en freezer a -20°C hasta los posteriores análisis.

- **Ácidos grasos**

Las muestras de lípidos totales se derivatizaron a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) para su identificación y cuantificación por cromatografía gaseosa.

Los lípidos se transesterificaron utilizando 1 ml de ácido sulfúrico al 1% en metanol como catalizador (Christie, 1982). Para favorecer la disolución evitar la oxidación de los lípidos neutros se añadió 0,5 ml de tolueno con Butilhidroxitolueno (BHT) (50mg/L). La reacción se llevó a cabo a 49°C durante 16 horas en atmósfera de nitrógeno. Luego se utilizó hexano:éter (1:1 v/v) para extraer los FAMES y una solución de KHCO₃ al (20g/L) para lavar el hexano:éter. Los FAMES se dejaron en desecador con sílica-gel durante 24 horas y se determinó la cantidad por gravimetría. Luego se llevó a una concentración de 30mg/ml con cloroformo y se guardó en atmósfera de nitrógeno a -20°C en freezer hasta su análisis.

Los FAMES se separaron para su identificación y cuantificación utilizando un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890) provisto de un detector de ionización de llama, una columna capilar de sílice fundida Supelcowax como fase estacionaria y de 30mx0.32mm D.I (Supelco, USA). Se usó Nitrógeno como gas portador. Las muestras fueron inyectadas en modo Split. Temperatura: inyector 250°C, detector 250°C. La columna se programó con una rampa con las siguientes características: temperatura inicial 180°C durante 10 min, tasa de incremento de temperatura 2,5°C/min, temperatura final 212°C durante 13 min. Se utilizó Chromatography Station for Windows (CSW 1.7 DataApex) para el procesamiento de los datos de los cromatogramas obtenidos. Los ácidos grasos fueron identificados mediante la comparación de los tiempos de retención de FAMES (Supelco) y por un aceite de pescado bien caracterizado (Salhi & Bessonart, 2013). Los datos de ácidos grasos están expresados en porcentaje del total de AG (AG±sd). Se identificaron 55 AG y se excluyeron aquellos ácidos grasos cuya concentración fue menor a 0.01% considerados traza, quedando así 48 AG.

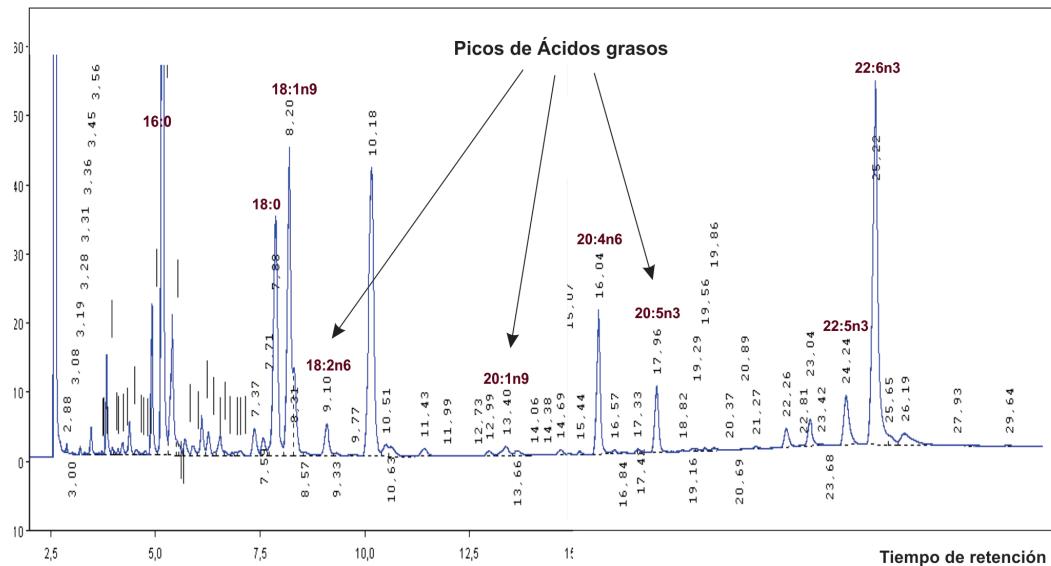


Figura 1.4. Cromatografía de gases (resultado gráfico del software asociado al cromatógrafo de gases utilizado en este estudio). Se muestran algunos ésteres metílicos de ácidos grasos reconocidos.

1.2.8 Coeficientes de calibración (CC)

Los coeficientes de calibración (CC) fueron calculados de acuerdo a lo propuesto por Iverson *et al.*, (2004). Los CC para cada ácido graso particular (x) se calculan como el 90% de la media acotada:

$$CC_x = \%AG_x \text{ predador} / \%AG_x \text{ presa}$$

Siendo x cada ácido graso; %AG la cantidad de ácido graso expresado como porcentaje del total de AG.

Esto permite que en la primera instancia de colecta de músculo se obtenga para el primer lenguado una matriz de CC de 12x48 AG (12 pues son las muestras de perfiles de AG de pejerrey inicial y 48 son los AG utilizados en el estudio). Como fueron 3 los individuos biopsiados en cada grupo de alimentación (pejerrey y lacha) entonces se obtendrá una matriz de CC de 36x48 AG para cada grupo. A estas matrices, se les calcula la media acotada al 90% para los 48 AG y se obtienen los CC promedio para pejerrey y lacha de la semana 5.

Se procede de igual forma para la semana 12 y para la 20, obteniéndose en cada caso matrices con un número de columnas diferentes, según sea la cantidad de biopsias musculares realizadas (Fig. 1.2). En la semana 20 a su vez, se hace lo mismo pero

con los hígados colectados, obteniéndose así los CC promedio para el hígado en cada grupo de alimentación.

1.2.9 Construcción de los subconjuntos de AG a ensayar

Debido a que la esencialidad de los ácidos grasos depende del grupo al que pertenezca el predador, y que además no todos ellos reflejan la dieta, según Iverson *et al.*, (2004) hay que construir y ensayar diferentes subconjuntos de estos AG para ver cómo responde el modelo.

Budge *et al.*, (2012) observó trabajando en estudios de alimentación contralada en *Salmo salar*, que los subconjuntos de AG que mejor reflejaban la dieta, no eran aquellos que sólo contenían AG dietarios, sino aquellos que además de estos últimos incorporaban otros endógenos (16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:0, etc.), lo que incrementaba de un 39% hasta un 90% el porcentaje del total de AG. Esta incorporación de AG no dietarios hace referencia justamente a aquellos que se encuentran en gran cantidad, y por ende estos investigadores proponen que una buena estrategia a la hora de diagramar dichos subconjuntos sería además de incorporar los AG dietarios, incorporar también los AG en función del porcentaje del total.

En el presente trabajo, con los 48 AG seleccionados para trabajar se construyeron 7 subconjuntos de AG. Estos variaron según la cantidad de AG incluidos, su carácter de esencialidad y su concentración (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Subconjuntos de ácidos grasos utilizados para evaluar la performance del modelo QFASA en *Paralichthys orbignyanus* durante el proceso de validación de dicho modelo.

| AG | Subset A | Subset B | Subset C | Subset D | Subset E | Subset F | Subset G |
|---------------|----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|
| 12:0 | X | | | | | | |
| 14:0 | X | | | | X | | X |
| 14:1 | X | | | | | | |
| 15:0 | X | | | | | | |
| 16:iso | X | | | | | | |
| 16:0 | X | | | | X | | X |
| 16:1n-7 | X | | | | X | | X |
| 16:1n-5 | X | | | | | | |
| 16:2 | X | X | X | X | X | | |
| 17:0 | X | | | | | | |
| 16:3n-4 | X | X | X | X | X | X | |
| 17:1 | X | | | | | | |
| 16:4n-3 | X | X | X | X | X | X | |
| 18:0 | X | | | | X | | X |
| 18:1n-9 | X | | | | X | | X |
| 18:1n-7 | X | | | | X | | X |
| 18:2n-6 | X | X | X | X | X | X | |
| 18:3n-6 | X | X | X | X | X | X | |
| 18:3n-3 | X | X | X | X | X | X | |
| 18:4n-3 | X | X | X | X | X | X | |
| 18:4n-1 | X | X | X | X | X | | |
| 20:0 | X | | | | | | |
| 20:1 | X | X | X | X | X | | |
| 20:2n-9 | X | | | | | | |
| 20:2n-6 | X | X | X | | | X | X |
| 20:3n-6 | X | X | X | | | X | X |
| 20:4n-6 | X | X | X | | | X | X |
| 20:3n-3 | X | X | | | | X | X |
| 20:4n-3 | X | X | | | | X | X |
| 20:5n-3 | X | X | | | | X | |
| 22:1 | X | X | X | X | X | | |
| 22:3n-6 | X | X | X | | | X | X |
| 22:4n-6 | X | X | X | | | X | X |
| 22:5n-6 | X | X | X | | | X | X |
| 22:5n-3 | X | X | | | | X | X |
| 22:6n-3 | X | X | | | | X | X |
| Número de AG | 36 | 21 | 16 | 10 | 16 | 17 | 16 |
| % total de AG | 97.8±1.3 | 34.0±10.6 | 17.9±5.6 | 12.6±4.3 | 71.0±10.4 | 32.1±11.8 | 80.8±5.0 |

Los datos del porcentaje del total de AG de la Tabla 1.2 corresponden al promedio del perfil de AG del músculo con piel y del hígado de la colecta de tejido de todos los lenguados en la semana 20.

Criterio de los 7 subconjuntos de AG creados:

Subconjunto A: Incluye 36 de los 55 AG que se identificaron, comprendiendo el $97.8 \pm 1.3\%$ del total de AG. Incluye todos los dietarios y casi todos los no dietarios (notar que de los 12 que faltan sólo suman aproximadamente el 2%).

Subconjunto B: Incluye casi exclusivamente los dietarios de 18, 20 y 22 carbonos de la serie n-3 y n-6, y excluye a los no dietarios o endógenos, por ende sólo comprende el $34.0 \pm 10.6\%$ del total de AG. Se incluyeron también el 16:2, 18:4n1, 20:1 y 22:1.

Subconjunto C: Idem que B, excluyendo además los n3-HUFA (comprende el $17.9 \pm 5.6\%$ del total de AG).

Subconjunto D: Sólo tiene 10 AG. Contiene los dietarios de 18 carbonos (como si fueran los AGE para un pez de agua dulce) y también el 20:1 y 22:1. Comprende el $12.6 \pm 4.3\%$ del total de AG).

Subconjunto E: Se construyó con el mismo criterio que el subconjunto D, pero se agregaron los no dietarios o “bultosos” y comprendió el $71.0 \pm 10.4\%$ del total de AG).

Subconjunto F: Se construyó con AG exclusivamente dietarios. El % del total de AG constituyó el $32.1 \pm 11.8\%$.

Subconjunto G: Se incluyeron los “bultosos” y los dietarios de 20 y 22 carbonos de la serie n-3 y n-6. El % del total de AG constituyó el $80.8 \pm 5.0\%$.

Cada vez que se confeccionó un subconjunto de AG para toda la base de datos, estos antes de correr el modelo se renormalizaban para que sumasen 100% entre todos los AG de la matriz.

1.2.10 Análisis cuantitativo del perfil de Ácidos grasos (QFASA por sus siglas en inglés)

En este trabajo el modelo QFASA desarrollado por Iverson *et al.*, (2004) fue adaptado para su uso en *Paralichthys orbignyanus* en la Laguna de Rocha. El modelo básicamente constituye un problema de optimización, lo que en su forma más simplificada constituye maximizar o minimizar una función. La optimización es un área en matemática que presenta muchas aplicaciones en la vida cotidiana. Es una actividad que muchas veces realizamos de manera inconsciente, por ejemplo a la hora de construir algo con la menor cantidad posible de material, obtener la máxima

ganancia en un negocio, llegar a un lugar en el menor tiempo posible, etc. Por ende un problema de optimización es generalmente un problema de decisión (Bertsekas, 1996).

La teoría de optimización clásica o programación matemática está constituida por un conjunto de resultados y métodos analíticos y numéricos enfocados a encontrar e identificar la mejor solución (con respecto a algún criterio) entre una compilación de alternativas, sin tener necesariamente que enumerar y evaluar explícitamente todas esas alternativas (Bertsekas, 1996).

Los problemas de optimización se describen mediante un conjunto de elementos, de los cuales, los más importantes son:

- ✓ *Las variables de decisión.* Son los valores que se modifican para resolver el problema.
- ✓ *Las funciones objetivo.* Es necesaria al menos una. Se expresan en términos de las variables de decisión y el resultado de su evaluación es el que se desea optimizar (maximizar o minimizar).
- ✓ *Las restricciones.* Desigualdades o ecuaciones que se tienen que cumplir para que la solución se considere factible. Puede ocurrir que el problema no presente restricciones, en cuyo caso todas las soluciones son válidas y el proceso de búsqueda se enfoca entonces en optimizar las funciones objetivo.

Notación y explicación del modelo. La estimación de la dieta de *Paralichthys orbignyanus* se obtuvo por medio de la búsqueda de qué combinación de matrices de perfiles de ácidos grasos de presas es la que más se parece a la matriz de AG del predador. Esto se implementó minimizando una distancia estadística (Kulback-Liebler) entre las matrices de AG de las presas y la del predador. Lo cual significa encontrar cuáles son los p_k (escalares) por los que multiplicar las matrices de AG de las presas, de forma tal que el resultado de éstos sea la matriz que más se asemeje a la matriz predador. A su vez, estos p_k , previa corrección por el tenor lipídico de las presas, constituirían el porcentaje de esa presa dentro de la dieta del predador.

Sea y un vector, cuyos elementos y_j describan la proporción de cada ácido graso j del predador.

El modelo procede generando una estimación de y como la suma ponderada de \hat{y} de los ácidos grasos de la presa:

$$\hat{y} = \sum_k p_k \hat{u}_k$$

donde \hat{u}_k es un vector, cuyos elementos \hat{u}_{kj} son los promedios de cada ácido graso j de cada tipo de presa k y p_k es un coeficiente de ponderación que corresponde a la proporción estimada de la presa k en la dieta del predador. El objetivo de este análisis es elegir los valores de p_k tales que la estimación de \hat{y} en el modelo esté lo más cerca posible del perfil real de y . Dado entonces que tanto y como \hat{y} pueden ser consideradas como distribuciones de ácidos grasos, la distancia Kulback-Liebler (KL) es la usada para comprar perfiles de ácidos grasos donde,

$$KL = \sum_j (y_j - \hat{y}_j) \log(y_j / \hat{y}_j)$$

Existen otras distancias para comparar distribuciones, como el error cuadrático (SQ), el error cuadrático relativo (REL) y el error cuadrático de los logaritmos (LSQ). La distancia SQ le atribuye el mismo peso a todos los valores de ácidos grasos, mientras que REL, LSQ y KL son distancias que le dan más peso a las diferencias absolutas entre ácidos grasos, por lo que son elegidas antes que SQ. A su vez, de éstas tres últimas es KL es más conservativa y proporcional con los ácidos grasos. Este concepto se puede ejemplificar considerando una diferencia absoluta de 0.01 entre y e \hat{y} (real y estimado) para la concentración tres ácidos grasos: uno común, otro intermedio y otro raro: 0.20, 0.05 y 0.01, lo que predecirá proporciones de 0.21, 0.06 y 0.02 respectivamente, desfavoreciendo de esta manera aquellos más raros o en menor proporción. La distancia KL es un medida no simétrica de la similitud o diferencia entre dos funciones de distribución de probabilidad, o sea constituye el promedio ponderado de la diferencia logarítmica entre las dos funciones de probabilidad y relativiza o le da mayor peso a los ácidos grasos “raros”.

Adicionalmente, esta optimización tiene restricciones: los valores de p_k tienen que ser positivos y entre todos sumar 1. Por lo tanto, la estimación se puede formular como un problema de optimización con restricciones:

$$\min KL = \sum_j (y_j - \hat{y}_j) \log(y_j / \hat{y}_j)$$

Sujeto a

$$\sum_j p_k = 1, p_k \geq 0$$

La optimización se realizó en Matlab 7.0 utilizando los paquetes de optimización del programa. De acuerdo con Iverson *et al.*, (2004), no se asumió ningún sesgo para ninguna presa de antemano, por lo que la optimización comenzó con todos los valores de p_k iguales. Para captar la variabilidad en los perfiles de ácidos grasos de las presas (introducido aquí como las diferencias entre los perfiles de AG de cada individuo presa de la muestra), se llevó a cabo un técnica de remuestreo de datos (bootstrap) con reposición. Se programó para 100 repeticiones, en donde en cada iteración, se sustrajera al azar un perfil de AG para cada ítem presa de la base de datos. Esto permitió captar la variabilidad en las presas expresadas como la desviación estándar en la dieta del predador.

Finalmente, luego de calcular los p_k para las diferentes presas, estos valores deben ser corregidos por el tenor lipídico de cada presa:

$$a_k = (p_k/f_k) / \sum_j p_k / f_k$$

Donde a_k será el porcentaje de cada presa ya corregido por el tenor lipídico, p_k la proporción estimada de cada presa en la dieta del predador y f_k el promedio del porcentaje de lípidos de esa presa expresado en peso húmedo

1.2.11 Validación del modelo en condiciones experimentales

La validación del QFASA adaptado para *P. orbignyanus* consistió en correr el modelo y comparar las salidas generadas contra lo que realmente habían consumido los lenguados durante el experimento. A su vez, al mismo tiempo en que se observa el ajuste con que estima la dieta real, se determinó cuál era el CC más apropiado para usar (pejerrey o lacha), a partir de qué tiempo se puede utilizar dicho CC, qué tejido de reserva refleja más la dieta y qué subconjunto de AG es el que mejor refleja la dieta ofrecida.

Para esto, durante este ejercicio se tomaron varios factores en consideración, muchos de los cuales resultan insumos claves y necesarios para la implementación del modelo en la naturaleza.

En este paso el modelo fue corrido tomando en cuenta y combinando diferentes

variables:

Temporal: se evaluó el modelo añadiendo los CC producidos en la semana 5, 12 y 20

Coeficientes de calibración: se evaluó el modelo corrigiendo el perfil de AG predador con los CC producidos tanto con presa pejerrey como con presa lacha. También se corrió el modelo tomando en cuenta el CC promedio entre los dos grupos (pejerrey y lacha semana 20).

Sin coeficientes: se evaluó el modelo sin introducir ninguna corrección al perfil de ácidos grasos del predador

Reservorio de lípidos: se evaluó el modelo tomando como reservorio de lípidos el músculo con piel y el hígado

Subconjunto de AG: se evaluó el modelo utilizando los 7 subconjuntos diferentes de AG diseñados

La matriz de AG de presas que se agregaron en el modelo durante su validación, no fueron solamente la matriz de AG de las dos dietas (pejerrey y lacha) del experimento de calibración, sino la matriz entera con todas las presas de la Laguna de Rocha. Esto se hizo para tener más confianza en los resultados de la estimación.

1.3 Resultados

1.3.1 *Paralichthys orbignyanus* en la naturaleza e índices

Se capturaron 75 lenguados adultos en la Laguna de Rocha, Arroyo Valizas y áreas costeras (océano Atlántico, Cabo Polonio). De éstos 48 fueron hembras y 27 machos. Según Mellito da Silveria *et al.*, (1995) trabajando con esta especie en la Laguna de los Patos y la región costera adyacente, determinaron que la talla de primera madurez sexual para *P. orbignyanus* es de 38,5 cm para hembras y 26,9 cm para machos.

La Tabla 1.2 muestra el largo total y el peso de lenguados adultos a los que se les colectó gónadas e hígado. Con estos ejemplares se realizó el cálculo de los índices K, IGS e IHS en diferentes meses del año.

Tabla 1.2. Largo total (LT) y Peso (P) de *Paralichthys orbignyanus* adultos colectados.

| | Hembras | | Machos | |
|-----------------|---------|--------|---------|--------|
| | LT (cm) | P (gr) | LT (cm) | P (gr) |
| Máximo | 62,5 | 3500 | 43,0 | 834 |
| Mínimo | 38,5 | 620 | 26,8 | 223 |
| Promedio | 47,7 | 1317 | 35,7 | 507 |
| Desvío estándar | 5,6 | 563 | 3,8 | 147 |

La Tabla 1.3 muestra los índices K, IHS e IGS calculados para los lenguados utilizados en esta etapa.

Tabla 1.3. Factor de condición (K), Índice hepatosomático (HIS) e Índice gonadosomático (IGS) de *Paralichthys orbignyanus* adultos.

| Mes | K | IHS | IGS Hembras | IGS Machos |
|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Diciembre/Enero* (n=16) | Prom 1,12 ab ± 0,10 Desv 0,10 | Prom 0,85 a ± 0,30 Desv 0,30 | Prom 0,81 a ± 0,25 Desv 0,25 | Prom 0,43 ± 0,18 Desv - |
| Abril (n=5) | 1,00 b ± 0,04 | 0,82 a ± 0,16 | 0,47 bc ± 0,08 | 0,04 ± - |
| Mayo (n= 8) | 1,11 ab ± 0,06 | 1,27 a ± 0,37 | 0,38 b ± 0,13 | 0,28 ± 0,21 |
| Julio (n=21) | 1,10 b ± 0,07 | 1,60 b ± 0,27 | 0,53 c ± 0,08 | 0,27 ± 0,07 |
| Octubre (n=25) | 1,19 a ± 0,12 | 1,69 c ± 0,51 | 0,71 abc ± 0,27 | 0,34 ± 0,11 |

Las letras dentro de la misma columna denotan diferencias significativas (p<0.05)

Los índices K, IGS y IHS presentan diferencias significativas entre los distintos meses, a excepción de los machos en el IGS.

El factor de condición fue mayor en octubre y menor en abril, coincidiendo con el comienzo y el final de la estación reproductiva para esta especie respectivamente, algo ya observado para esta especie por Gadea *et al.* (2015). El índice hepatosomático (IHS) tuvo variaciones según el mes y también fue mayor en octubre y menor en abril. Este índice, al igual que K estarían involucrados en procesos de almacenamiento de energía relacionados al proceso reproductivo (Costopoulos & Fonds, 1989).

El IGS en este trabajo fue mayor en los meses de diciembre/enero, difiriendo significativamente de abril, mayo y julio, pero no de Octubre. Los altos desvíos encontrados en el IGS probablemente se deban a la estrategia de desove de esta especie. *P. orbignyanus* es un desovante parcial, por lo que pasa cíclicamente por diferentes condiciones de desarrollo gonadal en un periodo corto de tiempo (Robaldo, 2003), por lo que en una estación de desove de 6 a 7 meses (octubre a abril) las gónadas de las hembras colectadas reflejarán en el peso estos diferentes estadios de desarrollo, y por consiguiente desvíos grandes en el IGS, lo que podría generar la ausencia de diferencias significativas entre octubre y los demás meses.

Debido a que tanto IHS como K muestran diferencias significativas entre estaciones, lo cual podría indicar que estuviesen relacionados al acúmulo de energía previo al desove, se tomarán en cuenta estos dos tejidos como posibles reservorios de energía, para la colecta de tejido de los los experimentos de alimentación controlada y así obtener los coeficientes de calibración.

La Tabla 1.4 muestra el porcentaje de lípidos en músculo con piel e hígado en temporada pre y post desove. Debido al gradiente entre estos dos períodos, se tomaron los valores del mes de mayo como post desove y los de octubre como pre desove.

Tabla 1.4. Porcentaje de lípidos en músculo con piel e hígado de lenguados adultos pre y post desove (tomados como octubre y mayo respectivamente). PH: Peso húmedo

| | Músculo con Piel | | Hígado | |
|-------------------------|------------------|------------|----------------|---------------|
| | % Lípidos | % Humedad | % Lípidos | % Humedad |
| Pre desove (Octubre) | 0,79 ± 0,28 a | 79,4 ± 3,9 | a 19,3 ± 4,0 a | 62,06 ± 4,5 a |
| Post desove (Mayo) | 0,47 ± 0,13 b | 81,7 ± 0,7 | a 14,9 ± 3,1 b | 67,13 ± 3,9 b |

Letras distintas dentro de la misma columna denotan diferencias significativas ($p<0.05$)

Se observa que en el músculo dorsal con piel y en el hígado existen diferencias significativas entre las dos temporadas, siendo mayor en ambos casos el porcentaje de lípidos (PH) en octubre.

1.3. 2 Coeficientes de calibración

Durante los experimentos de alimentación controlada los lenguados fueron alimentados a saciedad y siempre aceptaron las dietas ofrecidas en ambos grupos. Algo a destacar es que al día siguiente a cada biopsia muscular, los lenguados siguieron alimentándose normalmente, sin evidenciar mayores trastornos por la técnica invasiva utilizada. En la semana 20 del experimento, los lenguados del grupo alimentado con pejerrey aumentaron un 10,0% de peso, mientras que los lenguados alimentados con lacha aumentaron un 14% de su peso Tabla 1.5.

Tabla 1.5. Incremento de peso en los dos grupos de lenguados del experimento de alimentación controlada.

| | Biomasa inicial (gr) | Biomasa final (gr) | Incremento de peso (%) | Talla (cm) |
|--|----------------------|--------------------|------------------------|------------|
| Lenguados alimentados con pejerrey (n=9) | 5132 | 5646 | 10,0 | 41,6±3,4 |
| Lenguados alimentados con lacha (n=8) | 5832 | 6163 | 14,5 | 42,4±4,5 |

La biomasa inicial de los dos grupos de lenguados fueron parejas, con un número parejo de individuos en cada uno (Tabla 1.5). Esto es particularmente importante a la hora de trabajar con individuos vivos, ya que el comportamiento de alimentación a veces depende de la distribución de tallas y la cantidad de peces que haya en el tanque.

Los lenguados utilizados en el experimento de alimentación controlada fueron individuos adultos. Esto fue así ya que la aplicación del modelo en la Laguna de Rocha se iba a realizar también con lenguados adultos. Los peces crecen toda la vida, pero lo hacen más lentamente cuanto más viejos son. Al buscar que una dieta se vea

reflejada en los tejidos de un pez, resultaría ventajoso trabajar con animales más jóvenes en donde el porcentaje de incremento de peso por unidad de tiempo es mayor. Aún así, se trabajó con animales adultos para evitar sesgar los resultados, ya que durante el proceso de producción de gametos, los peces se enfrentan a la necesidad de asignar las reservas energéticas en procesos que intervienen en la reproducción además de las funciones básicas como son supervivencia y crecimiento. En la Tabla 1.5 se puede observar que pese a que el experimento duró tres meses, los lenguados alimentados con pejerrey y lacha crecieron un 10,0 y 14,5% respectivamente, lo que asegura que hayan comido y “asimilado” las dietas ofrecidas durante los ensayos.

Tabla 1.6. Porcentaje de lípidos en peso húmedo (PH) y % de humedad de todos los lenguados del experimento de alimentación controlada en la semana 5, 12 y 20 (músculo dorsal con piel) e hígado de la semana 20, de los filetes de alimento (pejerrey y lacha) y de los lenguados iniciales (músculo con piel e hígado). X= Promedio, DE= Desvío Estándar.

| | % Líp. PH | | % Humedad | |
|--|-----------|--------|-----------|--------|
| | X | DE | X | DE |
| Filetes lacha | 9,42 | ± 4,67 | 79,1 | ± 7,51 |
| Filetes Pejerrey | 2,90 | ± 0,72 | 77,9 | ± 2,60 |
| Músc. c/ piel Lenguados Inicial | 0,70 | ± 0,50 | 79,6 | ± 1,48 |
| Musc. c/piel Lenguados alimentados con lacha Semana 5 | 1,08 | ± 0,14 | - | ± - |
| Musc. c/piel Lenguados alimentados con lacha Semana 12 | 1,10 | ± 0,29 | - | ± - |
| Musc. c/piel Lenguados alimentados con lacha Semana 20 | 0,80 | ± 0,32 | 78,3 | ± 1,61 |
| Musc. c/piel Lenguados alimentados con pejerrey semana 5 | 0,73 | ± 0,28 | - | ± - |
| Musc. c/piel Lenguados alimentados con pejerrey semana 12 | 1,28 | ± 0,36 | - | ± - |
| Musc. c/piel Lenguados alimentados con pejerrey semana 20 | 0,74 | ± 0,30 | 78,8 | ± 0,81 |
| Hígado Lenguados Inicial | 14,9 | 3,08 | 67,1 | ± 3,49 |
| Hígado lenguados alimentados con lacha | 20,9 | ± 3,49 | 52,3 | ± 8,11 |
| Hígados lenguados alimentados con pejerrey | 15,7 | ± 2,02 | 60,6 | ± 0,82 |

El tenor lipídico del músculo con piel de los lenguados alimentados con pejerrey fue disminuyendo conforme pasó el tiempo, desde la semana 5 a la 20 (Tabla 1.6), no llegando y alejándose paulatinamente de los niveles de lípidos de su presa. En el grupo de lenguados alimentados con lacha, no se observó la misma tendencia, mostrando un comportamiento más errático (subió y bajó) llegando en la semana 20 a niveles parecidos a los del otro grupo. Los filetes de lacha tuvieron una mayor variación en el contenido de lípidos (desvío estándar relativa = 46,8%), lo que podría estar provocando estos cambios.

Aunque los filetes de lacha tienen mayor cantidad de lípidos (9,42% PH), que los filetes de pejerrey (2,90% PH), el músculo con piel de los lenguados de ambos grupos en la semana 20 no mostró diferencias significativas en cuanto al tenor lipídico

(P<0.05). En los lenguados alimentados con la presa de mayor contenido lipídico (lacha) se observó que tuvieron mayor cantidad de lípidos en sus hígados.

Los resultados del perfil de AG de una biopsia muscular (0,7x0,7x0,7 cm aprox.) y de un trozo grande de músculo con piel (1,5x1,5x1,5 cm aprox.) de un mismo individuo sacrificado en la colecta de tejido en la semana 20 de las experiencias de alimentación controlada se muestran en la Tabla 1.7. Se observa que ambos perfiles de AG son muy parecidos, confirmando que las biopsias musculares realizadas durante todo el experimento fueron suficientemente representativas de los cambios en el perfil de AG del músculo con piel.

Tabla 1.7. Perfil de AG de músculo con piel (trozo grande y biopsia) de un lenguado del experimento de alimentación controlada, alimentado con lacha. AG (Ácidos grasos); SAFA (Ácidos grasos saturados); MUFA (Ácidos grasos monoinsaturados); PUFA (Ácidos grasos poliinsaturados).

| AG | Trozo grande | Biopsia |
|-----------------|--------------|---------|
| 12:0 | 0,10 | 0,02 |
| 14:0 | 1,90 | 1,95 |
| 16:0 | 22,90 | 23,21 |
| 16:1n-5 | 3,10 | 3,17 |
| 16:2 | 0,90 | 0,92 |
| 16:3n-4 | 0,70 | 0,73 |
| 16:4n-1 | 0,80 | 0,00 |
| 16:4n-3 | 0,50 | 0,48 |
| 18:0 | 6,50 | 6,58 |
| 18:1n-9 | 10,80 | 10,99 |
| 18:1n-7 | 2,20 | 2,20 |
| 18:2n-9 | 0,10 | 0,04 |
| 18:2n-6 | 1,00 | 1,06 |
| 18:3n-9 | 0,00 | 0,00 |
| 18:3n-6 | 0,20 | 0,03 |
| 18:3n-3 | 0,30 | 0,33 |
| 18:4n-3 | 0,40 | 0,43 |
| 18:4n-1 | 0,10 | 0,07 |
| 20:0 | 0,40 | 0,39 |
| 20:1n9 | 1,00 | 0,96 |
| 20:2n-6 | 0,20 | 0,25 |
| 20:3n-9 | 0,20 | 0,22 |
| 20:3n-6 | 0,30 | 0,29 |
| 20:4n-6 | 4,00 | 4,05 |
| 20:3n-3 | 0,10 | 0,12 |
| 20:4n-3 | 0,50 | 0,55 |
| 20:5n-3 | 5,20 | 5,28 |
| 22:1n9 | 0,20 | 0,25 |
| 22:3n-6 | 0,30 | 0,32 |
| 22:4n-9 | 0,50 | 0,54 |
| 22:4n-6 | 1,60 | 1,67 |
| 22:5n-3 | 3,10 | 3,17 |
| 22:6n-3 | 24,20 | 24,55 |
| SAFA | 35,50 | 35,62 |
| MUFA | 18,11 | 18,36 |
| PUFA | 46,38 | 46,02 |
| n-9 | 12,93 | 13,00 |
| n-6 | 7,86 | 7,80 |
| n-3 | 34,33 | 34,79 |
| n-3 HUFA | 33,21 | 33,66 |
| n-6/n-3 | 0,20 | 0,22 |

Las Tablas 1.8 y 1.9 muestran los perfiles de AG del músculo de los lenguados alimentados con pejerrey y lacha respectivamente. Se muestra la evolución temporal del perfil de AG. La primer columna -igual en las dos tablas- muestra el perfil de AG inicial de los lenguados capturados en la Laguna, la segunda, tercera y cuarta columna de cada tabla corresponden a la semana 5, 12 y 20 del experimento y la última columna corresponde al perfil de ácidos grasos de la dieta consumida en cada experimento (pejerrey y lacha respectivamente).

Las figura 1.5 y 1.6 muestran también la evolución temporal de los perfiles de AG de músculo con piel de los dos grupos utilizados en el experimento, mostrando 21 AG seleccionados para observar su comportamiento en forma gráfica. En estas figuras se muestra agrupadas para cada AG seleccionado 5 barras: la primera corresponde al perfil de AG de los filetes de las presas consumidas (pejerrey Fig. 1.5 y lacha Fig. 1.6), la segunda corresponde al perfil de AG de músculo con piel inicial (lenguados de Laguna, igual para ambas figuras) y la tercer, cuarta y quinta barra corresponden al perfil de AG de músculo con piel de las colectas realizadas en la semana 5, 12 y 20 de cada tratamiento.

Tabla 1.8. Perfiles de AG de los músculos con piel de los lenguados alimentados con pejerrey en la semana 5, 12 y 20. Perfil de AG Inicial y de Pejerrey. AG (Ácidos grasos); X (promedio); DE (Desvío estándar); SAFA (Ácidos grasos saturados); MUFA (Ácidos grasos monoinsaturados); PUFA (Ácidos grasos poliinsaturados).

| AG | Perfil AG lenguados músculo con piel Inicial | | Perfil AG de lenguados alimentados con pejerrey biopsias músculo con piel | | | | Pejerrey | | | |
|----------------|--|--------|--|--------|-------|--------|----------|--------|-------|--------|
| | X | DE | X | DE | X | DE | X | DE | | |
| 12:0 | 0,07 | ± 0,01 | 0,11 | ± 0,03 | 0,32 | ± 0,04 | 0,04 | ± 0,03 | 0,20 | ± 0,04 |
| 14:0 | 2,25 | ± 0,95 | 5,95 | ± 0,95 | 2,20 | ± 1,18 | 2,15 | ± 1,35 | 2,8 | ± 1,12 |
| 14:1 | 0,24 | ± 0,11 | 0,24 | ± 0,02 | 0,15 | ± 0,06 | 0,11 | ± 0,05 | 0,18 | ± 0,02 |
| 15:0 | 0,60 | ± 0,28 | 1,16 | ± 0,09 | 0,84 | ± 0,05 | 0,53 | ± 0,30 | 1,01 | ± 0,28 |
| 16:iso | 0,03 | ± 0,01 | 0,16 | ± 0,01 | 0,11 | ± 0,03 | 0,03 | ± 0,01 | 0,07 | ± 0,02 |
| 16:aiso | 1,10 | ± 1,02 | 0,18 | ± 0,04 | 0,13 | ± 0,03 | 1,93 | ± 0,59 | 0,05 | ± 0,02 |
| 16:0 | 21,74 | ± 0,70 | 31,71 | ± 0,82 | 31,61 | ± 3,68 | 22,49 | ± 2,52 | 21,87 | ± 1,34 |
| 16:1n-7 | 4,58 | ± 1,46 | 7,83 | ± 0,51 | 5,60 | ± 1,31 | 5,22 | ± 2,20 | 6,89 | ± 0,48 |
| 16:1n-5 | 0,24 | ± 0,12 | 0,25 | ± 0,03 | 0,22 | ± 0,05 | 0,20 | ± 0,06 | 0,21 | ± 0,03 |
| 16:2 | 1,09 | ± 0,14 | 1,38 | ± 0,15 | 0,89 | ± 0,14 | 0,69 | ± 0,07 | 0,44 | ± 0,10 |
| 17:0 | 0,72 | ± 0,14 | 1,22 | ± 0,10 | 0,92 | ± 0,10 | 0,67 | ± 0,16 | 1,14 | ± 0,21 |
| 16:3n-4 | 0,63 | ± 0,30 | 1,17 | ± 0,14 | 1,10 | ± 0,14 | 0,96 | ± 0,27 | 1,34 | ± 0,26 |
| 17:1 | 0,26 | ± 0,09 | 0,29 | ± 0,01 | 0,28 | ± 0,05 | 0,22 | ± 0,04 | 0,42 | ± 0,10 |
| 16:4n-1 | 0,54 | ± 0,47 | 0,28 | ± 0,08 | 0,47 | ± 0,07 | 0,07 | ± 0,08 | 0,09 | ± 0,03 |
| 16:4n-3 | 0,36 | ± 0,14 | 0,19 | ± 0,01 | 0,38 | ± 0,12 | 0,42 | ± 0,09 | 0,10 | ± 0,02 |
| 18:0 | 6,55 | ± 0,97 | 10,47 | ± 0,83 | 10,08 | ± 1,35 | 6,62 | ± 1,27 | 4,66 | ± 0,66 |
| 18:1n-9 | 12,24 | ± 1,25 | 19,15 | ± 0,10 | 19,63 | ± 2,49 | 14,73 | ± 2,98 | 19,16 | ± 2,71 |
| 18:1n-7 | 3,17 | ± 0,72 | 4,01 | ± 0,00 | 3,88 | ± 0,51 | 3,02 | ± 0,80 | 3,83 | ± 0,46 |
| 18:2n-9 | 0,12 | ± 0,04 | 0,21 | ± 0,01 | 0,20 | ± 0,08 | 0,12 | ± 0,03 | 0,16 | ± 0,02 |
| 18:2n-6 | 1,66 | ± 0,60 | 1,04 | ± 0,15 | 1,38 | ± 0,36 | 1,36 | ± 0,28 | 1,06 | ± 0,80 |
| 18:3n-9 | 0,00 | ± 0,00 | 0,05 | ± 0,00 | 0,01 | ± 0,03 | 0,00 | ± 0,01 | 0,01 | ± 0,01 |
| 18:3n-6 | 0,20 | ± 0,06 | 0,19 | ± 0,02 | 0,15 | ± 0,06 | 0,18 | ± 0,04 | 0,30 | ± 0,10 |
| 18:3n-3 | 1,13 | ± 0,58 | 0,23 | ± 0,19 | 0,37 | ± 0,10 | 0,50 | ± 0,14 | 1,07 | ± 0,14 |
| 18:4n-3 | 1,01 | ± 0,85 | 0,17 | ± 0,07 | 0,12 | ± 0,10 | 0,31 | ± 0,11 | 0,68 | ± 0,08 |
| 18:4n-1 | 0,10 | ± 0,02 | 0,52 | ± 0,06 | 0,53 | ± 0,22 | 0,10 | ± 0,10 | 0,08 | ± 0,03 |
| 20:0 | 0,35 | ± 0,17 | 0,88 | ± 0,05 | 0,42 | ± 0,02 | 0,28 | ± 0,06 | 0,28 | ± 0,05 |
| 20:1n11 | 0,21 | ± 0,12 | 0,00 | ± 0,00 | 0,18 | ± 0,06 | 0,15 | ± 0,06 | 0,47 | ± 0,12 |
| 20:1n9 | 0,47 | ± 0,10 | 2,17 | ± 0,31 | 0,82 | ± 0,18 | 0,79 | ± 0,26 | 0,75 | ± 0,11 |
| 20:1n7 | 0,28 | ± 0,09 | 0,45 | ± 0,01 | 0,36 | ± 0,12 | 0,25 | ± 0,08 | 0,37 | ± 0,05 |
| 20:2n-9 | 0,01 | ± 0,02 | 0,02 | ± 0,03 | 0,00 | ± 0,00 | 0,03 | ± 0,07 | 0,08 | ± 0,07 |
| 20:2n-6 | 0,13 | ± 0,02 | 0,32 | ± 0,03 | 0,16 | ± 0,16 | 0,10 | ± 0,07 | 0,10 | ± 0,03 |
| 20:3n-9 | 0,41 | ± 0,08 | 0,31 | ± 0,04 | 0,44 | ± 0,09 | 0,31 | ± 0,05 | 0,46 | ± 0,02 |
| 20:3n-6 | 0,27 | ± 0,13 | 0,30 | ± 0,02 | 0,28 | ± 0,06 | 0,23 | ± 0,06 | 0,20 | ± 0,03 |
| 21:0 | 0,00 | ± 0,00 | 0,11 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 | 0,02 | ± 0,02 |
| 20:4n-6 | 3,78 | ± 2,08 | 0,66 | ± 0,32 | 2,24 | ± 1,10 | 4,43 | ± 0,99 | 2,59 | ± 0,27 |
| 20:3n-3 | 0,39 | ± 0,11 | 0,07 | ± 0,04 | 0,14 | ± 0,07 | 0,19 | ± 0,04 | 0,30 | ± 0,04 |
| 20:4n-3 | 0,67 | ± 0,35 | 0,14 | ± 0,05 | 0,18 | ± 0,05 | 0,33 | ± 0,07 | 0,36 | ± 0,12 |
| 20:5n-3 | 3,74 | ± 1,10 | 0,40 | ± 0,25 | 1,14 | ± 0,78 | 3,92 | ± 1,04 | 5,46 | ± 2,11 |
| 22:0 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 |
| 22:1n11 | 0,09 | ± 0,02 | 0,11 | ± 0,01 | 0,14 | ± 0,18 | 0,09 | ± 0,02 | 0,10 | ± 0,03 |
| 22:1n9 | 0,18 | ± 0,04 | 0,51 | ± 0,04 | 0,22 | ± 0,05 | 0,24 | ± 0,05 | 0,11 | ± 0,02 |
| 22:1n7 | 0,23 | ± 0,06 | 0,20 | ± 0,01 | 0,18 | ± 0,07 | 0,16 | ± 0,04 | 0,17 | ± 0,02 |
| 22:3n-6 | 0,29 | ± 0,08 | 0,15 | ± 0,01 | 0,18 | ± 0,09 | 0,24 | ± 0,08 | 0,31 | ± 0,04 |
| 22:4n-9 | 0,72 | ± 0,44 | 0,16 | ± 0,08 | 0,41 | ± 0,15 | 0,76 | ± 0,12 | 0,48 | ± 0,09 |
| 22:4n-6 | 1,14 | ± 0,71 | 0,10 | ± 0,05 | 0,54 | ± 0,15 | 1,14 | ± 0,28 | 0,67 | ± 0,09 |
| 22:5 n6 | 0,11 | ± 0,02 | 0,06 | ± 0,01 | 0,01 | ± 0,03 | 0,09 | ± 0,04 | 0,11 | ± 0,05 |
| 22:4 n3 | 0,01 | ± 0,03 | 0,00 | ± 0,00 | 0,01 | ± 0,03 | 0,00 | ± 0,00 | 0,01 | ± 0,01 |
| 22:5n-3 | 3,53 | ± 0,29 | 0,46 | ± 0,15 | 1,42 | ± 0,77 | 3,88 | ± 1,14 | 4,32 | ± 0,75 |
| 24:0 | 0,00 | ± 0,00 | 0,02 | ± 0,03 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,01 | 0,00 | ± 0,00 |
| 22:6n-3 | 21,48 | ± 4,93 | 2,51 | ± 0,81 | 5,80 | ± 3,81 | 18,71 | ± 7,59 | 14,47 | ± 1,96 |

| % total AG | 99,08 | 98,27 | 96,85 | 99,00 | 99,95 |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| SAFA | 33,41 ± 1,42 | 53,70 ± 1,27 | 46,64 ± 4,71 | 34,75 ± 4,30 | 32,12 ± 1,55 |
| MUFA | 22,16 ± 3,37 | 35,21 ± 0,99 | 31,66 ± 4,19 | 25,17 ± 6,56 | 32,64 ± 2,50 |
| PUFA | 44,43 ± 2,30 | 11,09 ± 2,26 | 21,70 ± 6,89 | 40,08 ± 9,74 | 35,24 ± 2,68 |
| n-9 | 14,14 ± 1,48 | 22,59 ± 0,30 | 21,72 ± 2,67 | 16,98 ± 3,38 | 21,21 ± 2,83 |
| n-6 | 7,57 ± 3,36 | 2,82 ± 0,54 | 4,95 ± 1,71 | 7,76 ± 0,87 | 5,34 ± 0,65 |
| n-3 | 31,93 ± 4,60 | 4,17 ± 1,56 | 9,42 ± 5,39 | 28,08 ± 9,36 | 26,77 ± 2,07 |
| n-3 HUFA | 29,81 ± 4,70 | 3,59 ± 1,30 | 8,69 ± 5,31 | 27,03 ± 9,45 | 24,92 ± 1,97 |

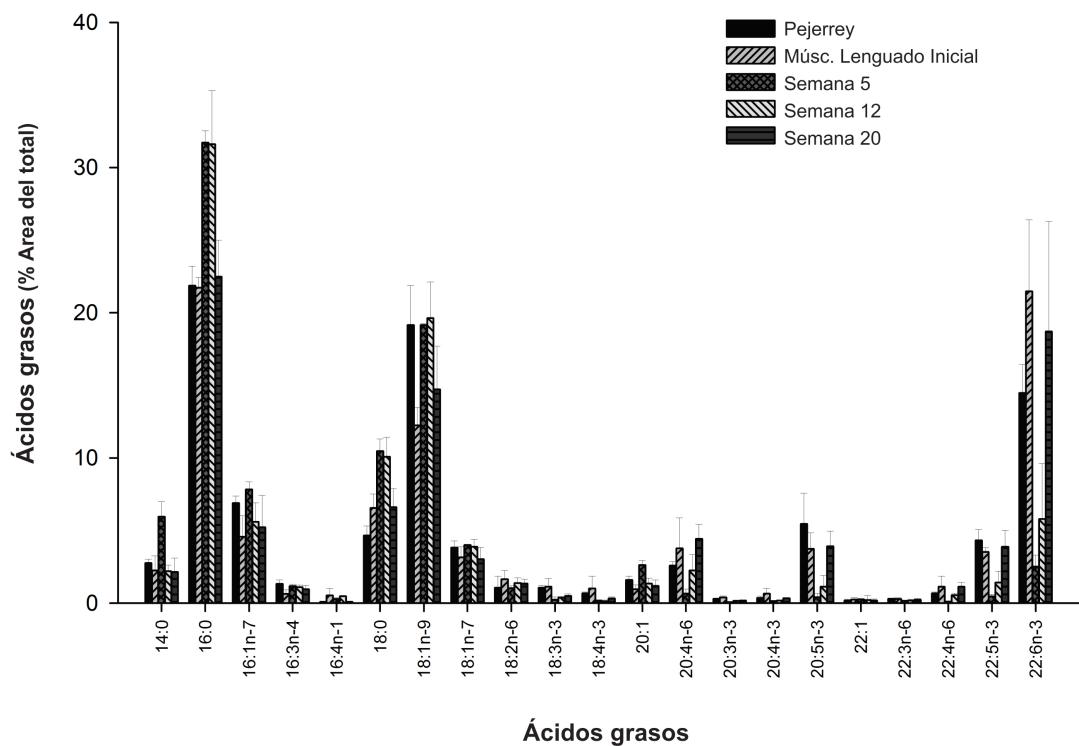


Figura 1.5. Evolución del algunos ácidos grasos elegidos durante las experiencias de alimentación controlada, grupo de lenguados alimentados con pejerrey. Las barras son el promedio de los AG, mostrando el desvío estándar.

Tabla 1.9. Evolución del Perfil de AG de los músculos con piel de los lenguados alimentados con lacha. AG (Ácidos grasos); X (promedio); DE (Desvío estándar); SAFA (Ácidos grasos saturados); MUFA (Ácidos grasos monoinsaturados); PUFA (Ácidos grasos poliinsaturados).

| AG | Perfil AG lenguados músculo con piel Inicial | | Perfil AG de lenguados alimentados con lacha biopsias músculo con piel | | | | Lacha | | |
|-------------------|--|--------|---|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------|
| | X | DE | X | DE | X | DE | X | DE | |
| 12:0 | 0,07 | ± 0,01 | 0,12 | ± 0,05 | 0,39 | ± 0,14 | 0,07 | ± 0,06 | |
| 14:0 | 2,25 | ± 1,13 | 2,76 | ± 1,72 | 3,41 | ± 1,79 | 2,87 | ± 1,56 | |
| 14:1 | 0,24 | ± 0,11 | 0,30 | ± 0,25 | 0,19 | ± 0,03 | 0,16 | ± 0,06 | |
| 15:0 | 0,60 | ± 0,28 | 0,96 | ± 0,13 | 0,86 | ± 0,29 | 0,46 | ± 0,21 | |
| 16:iso | 0,03 | ± 0,01 | 0,13 | ± 0,01 | 0,11 | ± 0,06 | 0,04 | ± 0,02 | |
| 16:aiso | 1,10 | ± 1,02 | 0,17 | ± 0,02 | 0,23 | ± 0,14 | 2,33 | ± 0,94 | |
| 16:0 | 21,74 | ± 0,70 | 35,55 | ± 5,82 | 28,96 | ± 5,96 | 27,49 | ± 5,85 | |
| 16:1n-7 | 4,58 | ± 1,46 | 5,72 | ± 3,11 | 5,73 | ± 2,31 | 4,40 | ± 2,05 | |
| 16:1n-5 | 0,24 | ± 0,12 | 0,29 | ± 0,11 | 0,22 | ± 0,04 | 0,23 | ± 0,09 | |
| 16:2 | 1,09 | ± 0,14 | 1,01 | ± 0,06 | 1,19 | ± 0,35 | 1,08 | ± 0,21 | |
| 17:0 | 0,72 | ± 0,14 | 1,10 | ± 0,24 | 0,75 | ± 0,21 | 0,73 | ± 0,15 | |
| 16:3n-4 | 0,63 | ± 0,30 | 1,16 | ± 0,06 | 0,89 | ± 0,28 | 0,96 | ± 0,25 | |
| 17:1 | 0,26 | ± 0,09 | 0,32 | ± 0,04 | 0,23 | ± 0,12 | 0,21 | ± 0,09 | |
| 16:4n-1 | 0,54 | ± 0,47 | 0,35 | ± 0,17 | 0,57 | ± 0,27 | 0,28 | ± 0,39 | |
| 16:4n-3 | 0,36 | ± 0,14 | 0,22 | ± 0,03 | 0,29 | ± 0,11 | 0,43 | ± 0,12 | |
| 18:0 | 6,55 | ± 0,97 | 11,75 | ± 1,98 | 8,66 | ± 1,44 | 8,63 | ± 2,43 | |
| 18:1n-9 | 12,24 | ± 1,25 | 19,84 | ± 2,21 | 19,01 | ± 5,88 | 12,76 | ± 2,60 | |
| 18:1n-7 | 3,17 | ± 0,72 | 4,22 | ± 1,44 | 3,66 | ± 0,68 | 2,92 | ± 0,59 | |
| 18:2n-9 | 0,12 | ± 0,04 | 0,22 | ± 0,06 | 0,16 | ± 0,04 | 0,08 | ± 0,06 | |
| 18:2n-6 | 1,66 | ± 0,60 | 1,16 | ± 0,55 | 1,64 | ± 0,84 | 1,81 | ± 0,97 | |
| 18:3n-9 | 0,00 | ± 0,00 | 0,08 | ± 0,07 | 0,03 | ± 0,03 | 0,01 | ± 0,02 | |
| 18:3n-6 | 0,20 | ± 0,06 | 0,14 | ± 0,07 | 0,23 | ± 0,05 | 0,15 | ± 0,11 | |
| 18:3n-3 | 1,13 | ± 0,58 | 0,40 | ± 0,21 | 0,38 | ± 0,10 | 0,41 | ± 0,09 | |
| 18:4n-3 | 1,01 | ± 0,85 | 0,08 | ± 0,07 | 0,37 | ± 0,27 | 0,36 | ± 0,35 | |
| 18:4n-1 | 0,10 | ± 0,02 | 0,70 | ± 0,28 | 0,43 | ± 0,26 | 0,26 | ± 0,22 | |
| 20:0 | 0,35 | ± 0,17 | 0,56 | ± 0,08 | 0,60 | ± 0,19 | 0,49 | ± 0,12 | |
| 20:1n11 | 0,21 | ± 0,12 | 0,15 | ± 0,26 | 0,16 | ± 0,16 | 0,11 | ± 0,04 | |
| 20:1n9 | 0,47 | ± 0,10 | 1,09 | ± 0,29 | 1,73 | ± 0,76 | 1,08 | ± 0,65 | |
| 20:1n7 | 0,28 | ± 0,09 | 0,46 | ± 0,02 | 0,40 | ± 0,13 | 0,24 | ± 0,19 | |
| 20:2n-9 | 0,01 | ± 0,02 | 0,34 | ± 0,02 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 | |
| 20:2n-6 | 0,13 | ± 0,02 | 0,15 | ± 0,08 | 0,27 | ± 0,14 | 0,23 | ± 0,20 | |
| 20:3n-9 | 0,41 | ± 0,08 | 0,33 | ± 0,04 | 0,45 | ± 0,10 | 0,36 | ± 0,12 | |
| 20:3n-6 | 0,27 | ± 0,13 | 0,33 | ± 0,04 | 0,42 | ± 0,16 | 0,40 | ± 0,17 | |
| 21:0 | 0,00 | ± 0,00 | 0,07 | ± 0,12 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 | |
| 20:4n-6 | 3,78 | ± 2,08 | 0,84 | ± 0,11 | 2,85 | ± 3,22 | 4,49 | ± 2,79 | |
| 20:3n-3 | 0,39 | ± 0,11 | 0,09 | ± 0,08 | 0,15 | ± 0,11 | 0,12 | ± 0,06 | |
| 20:4n-3 | 0,67 | ± 0,35 | 0,06 | ± 0,07 | 0,27 | ± 0,17 | 0,40 | ± 0,31 | |
| 20:5n-3 | 3,74 | ± 1,10 | 0,29 | ± 0,08 | 1,26 | ± 1,30 | 2,83 | ± 2,34 | |
| 22:0 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 | |
| 22:1n11 | 0,09 | ± 0,02 | 0,16 | ± 0,04 | 0,13 | ± 0,06 | 0,12 | ± 0,04 | |
| 22:1n9 | 0,18 | ± 0,04 | 0,30 | ± 0,04 | 0,39 | ± 0,13 | 0,30 | ± 0,08 | |
| 22:1n7 | 0,23 | ± 0,06 | 0,22 | ± 0,02 | 0,17 | ± 0,05 | 0,18 | ± 0,07 | |
| 22:3n-6 | 0,29 | ± 0,08 | 0,21 | ± 0,07 | 0,23 | ± 0,19 | 0,54 | ± 0,43 | |
| 22:4n-9 | 0,72 | ± 0,44 | 0,20 | ± 0,01 | 0,57 | ± 0,66 | 0,86 | ± 0,53 | |
| 22:4n-6 | 1,14 | ± 0,71 | 0,11 | ± 0,04 | 0,74 | ± 0,84 | 1,29 | ± 0,59 | |
| 22:5 n6 | 0,11 | ± 0,02 | 0,02 | ± 0,02 | 0,04 | ± 0,09 | 0,09 | ± 0,09 | |
| 22:4 n3 | 0,01 | ± 0,03 | 0,01 | ± 0,02 | 0,01 | ± 0,03 | 0,00 | ± 0,00 | |
| 22:5n-3 | 3,53 | ± 0,29 | 0,33 | ± 0,14 | 1,63 | ± 1,56 | 2,41 | ± 1,17 | |
| 24:0 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 | |
| 22:6n-3 | 21,48 | ± 4,93 | 2,92 | ± 0,92 | 6,72 | ± 6,15 | 12,94 | ± 7,89 | |
| % total AG | 99,08 | | 98,03 | | 97,80 | | 98,60 | | |
| SAFA | 33,41 | ± 1,42 | 55,14 | ± 7,39 | 43,98 | ± 8,36 | 43,09 | ± 8,19 | |
| | | | | | | | | 46,5 | ± 9,33 |

| | | | | | |
|-----------------|--------------|--------------|---------------|---------------|-------------|
| MUFA | 22,16 ± 3,37 | 33,07 ± 7,62 | 32,02 ± 7,77 | 22,71 ± 5,78 | 32,2 ± 5,43 |
| PUFA | 44,43 ± 2,30 | 11,79 ± 0,60 | 24,00 ± 13,34 | 34,19 ± 11,22 | 21,3 ± 10,0 |
| n-9 | 14,14 ± 1,48 | 22,41 ± 2,50 | 22,35 ± 6,07 | 15,45 ± 2,91 | 18,7 ± 4,34 |
| n-6 | 7,57 ± 3,36 | 2,97 ± 0,69 | 6,42 ± 4,72 | 9,00 ± 4,20 | 3,7 ± 0,91 |
| n-3 | 31,93 ± 4,60 | 4,40 ± 0,47 | 10,93 ± 9,18 | 19,78 ± 11,67 | 13,3 ± 8,62 |
| n-3 HUFA | 29,81 ± 4,70 | 3,70 ± 0,61 | 10,04 ± 8,94 | 18,71 ± 11,39 | 11,0 ± 7,32 |

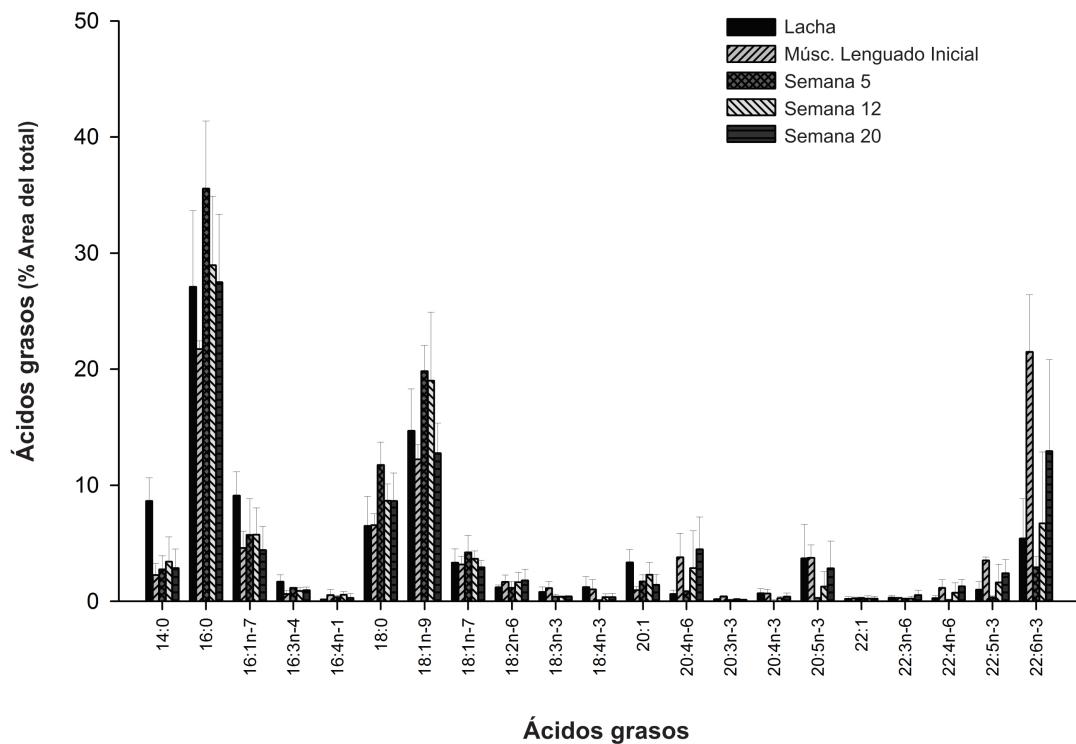


Figura 1.6. Evolución del algunos ácidos grasos elegidos durante las experiencias de alimentación controlada, grupo de lenguados alimentados con lacha. Las barras son el promedio de los AG, mostrando el desvío estándar.

El perfil de ácidos grasos del músculo con piel de los lenguados del experimento de alimentación controlada mostró variaciones durante las instancias de colecta de tejidos en la semana 5, 12 y 20 como resultado de las dos dietas ofrecidas: pejerrey o lacha (Tablas 1.8 y 1.9, Figs. 1.5, 1.6).

En la semana 5, tanto los lenguados alimentados con pejerrey o con lacha tuvieron un perfil de ácidos grasos similar entre sí: los ácidos grasos saturados (SAFA) representaron 53,7% y 55,1%, los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) representaron un 35,3% y 33,1% y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)

representaron 11,1% y 11,8% respectivamente. Ningún ácido graso específico mostró mayor diferencia entre ambos grupos para la semana 5 (Tabla 1.8 y 1.9). Lo que si fue evidente, fue la diferencia muy marcada con el perfil de ácidos grasos de los lenguados inicial (de la Laguna de Rocha): SAFA: 33,4%, MUFA: 22,1% y PUFA: 44,4%. Estos perfiles de AG, aunque fueron muy parecidos entre ambos grupos de alimentación, difirieron mucho del perfil de ácidos grasos inicial (Tablas 1.7 y 1.8). Los SAFA en la semana 5 pasaron a representar más del 50%, del 33% inicial, los MUFA aproximadamente 34% del 22% inicial y los PUFA (que fueron los que disminuyeron) lo hicieron a aproximadamente 11% del 44% que representaban inicialmente. Este comportamiento se puede deber a que durante la aclimatación que duró aproximadamente 3 meses, todos los lenguados utilizados en ambos grupos del experimento fueron alimentados por igual con el alimento de rutina de la Estación biológica de Cabo Polonio, y el perfil de AG Inicial de este estudio corresponde al perfil de AG de la Laguna (por razones preventivas no se colectó músculo en la semana 0 del experimento). Aún así, se puede observar que para esta especie 5 semanas de alimentación controlada no resulta un tiempo suficiente para que se diferencien ambos grupos del perfil que tenían.

La figura 1.7 esquematiza cómo fueron cambiando los SAFA, MUFA y PUFA del músculo con piel durante todo el experimento de alimentación controlada, tanto en el grupo de lenguados alimentados con pejerrey como con lacha, los lenguados iniciales de Laguna y los dos ítems de alimentación (pejerrey y lacha).

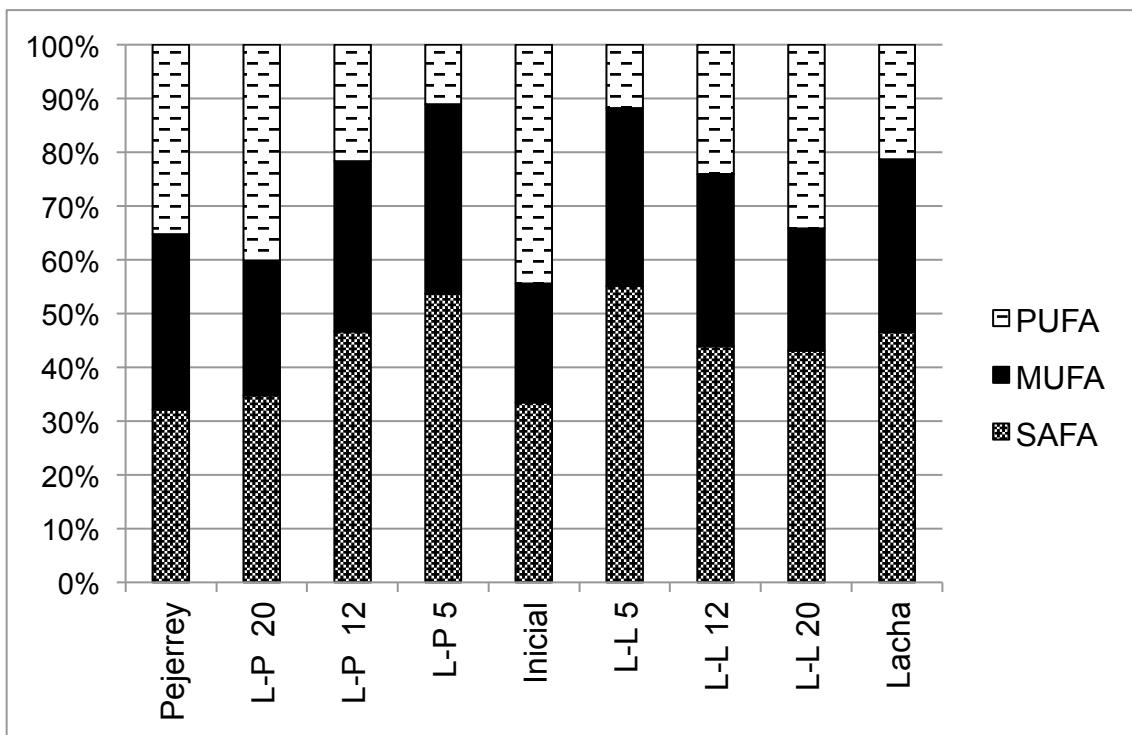


Figura 1.7. Evolución de los ácidos grasos saturados (SAFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) durante el experimento de alimentación controlada. L-P 20, L-P 12 y L-P 5 (Músculo con piel de lenguados alimentados con pejerrey semana 20, 12 y 5). L-L 20, L-L 12, L-L 5 (Músculo con piel de lenguados alimentados con lacha semana 20, 12 y 5).

En la semana 12, el perfil de ácidos grasos de ambos grupos comenzó a diferenciarse entre ellos, principalmente los SAFA disminuyeron en ambos grupos, aunque fue más notorio en el grupo alimentado con lacha que bajó de 55% a 43% y en el grupo alimentado con pejerrey de 53% a 47% (Tabla 1.8 y 1.9, Fig. 1.7). Esto puede ser debido principalmente a que el nivel de SAFA de la lacha es mucho más alto (46,5%) que en el pejerrey (32,1%). Los MUFA casi no cambiaron su porcentaje desde la semana 5, permaneciendo parecidos entre ellos (31,7% y 32,0%) para el grupo alimentado con pejerrey y lacha respectivamente. Estos valores tampoco son muy diferentes a los de sus presas (32,6% y 32,2%). Con respecto a los PUFA, luego de 12 semanas ambos grupos casi duplicaron su valor 21,7% y 24,0% para el grupo alimentado con pejerrey y con lacha respectivamente. Este valor, si bien fue parecido entre grupos, para el alimentado con pejerrey, los PUFA estuvieron mucho más lejanos al nivel de su presa (21,7% vs 35,2%) que en el grupo de alimentado con lacha (24,0% vs 21,3%). Las diferencias más notorias encontradas en esta etapa del experimento se debieron principalmente a 16:0 y 18:0 menores en el grupo alimentado con lacha, y a los ácidos grasos altamente insaturados de la serie n-3 (n3-HUFA) menores en el grupo alimentado con pejerrey.

En la semana 20, el perfil de ácidos grasos de ambos grupos mostró las mayores diferencias entre grupos. Los SAFA fueron 34,8% y 43,1%, los MUFA fueron 25,2% y 22,7% y los PUFA fueron 40,1% y 34,2% (Tabla 1.8 y 1.9, Fig. 1.7) para pejerrey y lacha respectivamente, asemejándose más en casa caso a la dieta consumida. En el grupo alimentado con pejerrey, el perfil de ácidos grasos comparado con el de su dieta fue para los SAFA 34,8% y 32,1%, para los MUFA 25,2% y 32,6% y para los PUFA 40,1% y 35,2% respectivamente. En el grupo alimentado con lacha, el perfil de ácidos grasos comparado con el de su dieta fue para los SAFA 43,1% y 46,5%, para los MUFA 22,7% y 32,2% y para los PUFA 34,2% y 21,3% respectivamente. Aquí se observa que con respecto a los SAFA, ambos grupos se asemejaron más a su presa, no así para los MUFA que fueron en donde mostraron mayor diferencia con su presa, y por último para los PUFA el grupo alimentado con pejerrey se asemejó más a su presa pero el grupo lacha se alejó bastante. Fue justamente en los PUFA donde se observaron mayores diferencias, relacionadas principalmente al contenido de n3-HUFA, que fue mayor en la presa pejerrey (24,9%) que en la presa lacha (11,0%) (Tablas 1.8, 1.9 y Fig. 1.7).

Las mayores diferencias entre ácidos grasos entre las presas consumidas por los lenguados del experimento fueron en el pejerrey que tiene valores superiores para 18:1n-9, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3 y 22:6n-3 (mayoritariamente poliinsaturados) mientras que en la lacha fueron ácidos grasos saturados y monoinsaturados los que mostraron los mayores niveles: 14:0, 16:0, 16:1n-7, 18:0 y 20:1 (Tablas 1.8 y 1.9). Sin embargo, los AG preponderantes en la lacha fueron superiores en los lenguados alimentados con pejerrey en la semana 5, pero ya en la semana 20, fueron los lenguados alimentados con lacha los que mostraron mayores niveles para estos ácidos grasos. Con respecto a los ácidos grasos preponderantes en el pejerrey (18:1n-9, 20:5n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3), los niveles de éstos son muy similares en los dos grupos de alimentación, observándose un aumento en la semana 20 en los lenguados alimentados con pejerrey (Tablas 1.8 y 1.9). En el caso del 20:4n6, el nivel en el pejerrey es 4 veces superior al de la lacha, sin embargo, en la semana 20 ambos grupos de lenguados tuvieron un nivel parecido de éste ácido (aproximadamente 4%), y desde la semana 5 a la 12 fueron subiendo parejo en ambos grupos (0,7/0,8% y 2,2/2,9%) para grupo alimentado con pejerrey y lacha respectivamente. Para el 20:5n3, a pesar de que los niveles iniciales de fueron altos (21,5%) los lenguados en la semana 5 muestran niveles bajos (2,5/2,9%), aumentando en la semana 12

(5,8/6,7%) y alcanzando los mayores niveles (18,7/12,9%) a pesar de que las presas muestran niveles bien distintos (14,5/5,42%) para pejerrey y lacha respectivamente. Los valores de 18:2n6 y 18:3n3 fueron similares en ambas presas y no mostraron grandes variaciones durante todo el experimento.

Hacia la semana 20 los perfiles de AG de los dos grupos se fueron diferenciando y pareciendo cada vez más a su presa. Aunque con estos resultados no se puede afirmar que se haya alcanzado el nivel máximo de reflejo de la dieta consumida, pues no hubieron dos instancias de colecta consecutiva (dentro del mismo grupo de alimentación) en donde los perfiles de AG fueran constantes.

Las tablas 1.10 y 1.11 muestran los perfiles de AG del hígado de los lenguados alimentados con pejerrey y lacha respectivamente. Como el hígado se colectó solamente en la semana 20 (puesto que había que sacrificarlos) los datos que se disponen son los iniciales de Laguna de Rocha, el perfil de AG de hígado de la semana 20 para cada grupo y el perfil de AG de pejerrey y lacha.

La figura 1.8 esquematiza los SAFA, MUFA y PUFA durante el experimento de alimentación controlada, para los hígados de los lenguados de cada grupo, así como para los lenguados iniciales, y las presas ofrecidas (pejerrey y lacha).

Tabla 1.10. Perfil de AG de los hígados de los lenguados alimentados con pejerrey, de los lenguados iniciales y del pejerrey. AG (Ácido graso); X (promedio); DE (Desvío estándar); SAFA (Ácidos grasos saturados); MUFA (Ácidos grasos monoinsaturados); PUFA (Ácidos grasos poliinsaturados).

| AG | Perfil AG lenguados Hígado Inicial | | Perfil AG lenguados Hígado semana 20 | | Pejerrey | |
|----------------|---------------------------------------|--------|---|--------|--------------|--------|
| | X | DE | X | DE | X | DE |
| 12:0 | 0,11 | ± 0,05 | 0,06 | ± 0,02 | 0,20 | ± 0,04 |
| 14:1 | 0,17 | ± 0,04 | 0,21 | ± 0,01 | 0,18 | ± 0,02 |
| 15:0 | 0,96 | ± 0,19 | 0,84 | ± 0,02 | 1,01 | ± 0,28 |
| 16:iso | 0,06 | ± 0,01 | 0,03 | ± 0,01 | 0,07 | ± 0,02 |
| 16:aiso | 0,18 | ± 0,03 | 0,04 | ± 0,03 | 0,05 | ± 0,02 |
| 16:0 | 29,85 | ± 1,99 | 21,49 | ± 1,84 | 21,87 | ± 1,34 |
| 16:1n-7 | 12,98 | ± 2,14 | 8,99 | ± 0,59 | 6,89 | ± 0,48 |
| 16:1n-5 | 0,11 | ± 0,25 | 0,27 | ± 0,06 | 0,21 | ± 0,03 |
| 16:2 | 1,40 | ± 0,14 | 2,03 | ± 0,09 | 0,44 | ± 0,10 |
| 17:0 | 0,83 | ± 0,17 | 0,00 | ± 0,00 | 1,14 | ± 0,21 |
| 16:3n-4 | 1,23 | ± 0,25 | 1,41 | ± 0,03 | 1,34 | ± 0,26 |
| 17:1 | 0,06 | ± 0,13 | 0,26 | ± 0,02 | 0,42 | ± 0,10 |
| 16:4n-1 | 0,26 | ± 0,04 | 0,00 | ± 0,00 | 0,09 | ± 0,03 |
| 16:4n-3 | 0,11 | ± 0,01 | 0,05 | ± 0,01 | 0,10 | ± 0,02 |
| 18:0 | 4,75 | ± 0,40 | 3,14 | ± 0,21 | 4,66 | ± 0,66 |
| 18:1n-9 | 22,62 | ± 3,31 | 20,25 | ± 1,50 | 19,16 | ± 2,71 |
| 18:1n-7 | 7,71 | ± 0,78 | 4,30 | ± 0,30 | 3,83 | ± 0,46 |
| 18:2n-9 | 0,53 | ± 0,12 | 0,15 | ± 0,04 | 0,16 | ± 0,02 |
| 18:2n-6 | 1,06 | ± 0,30 | 0,67 | ± 0,56 | 1,06 | ± 0,80 |
| 18:3n-9 | 0,07 | ± 0,05 | 0,01 | ± 0,01 | 0,01 | ± 0,01 |
| 18:3n-6 | 0,17 | ± 0,08 | 0,34 | ± 0,02 | 0,30 | ± 0,10 |
| 18:3n-3 | 0,87 | ± 0,15 | 0,46 | ± 0,04 | 1,07 | ± 0,14 |
| 18:4n-3 | 0,25 | ± 0,04 | 0,72 | ± 0,04 | 0,68 | ± 0,08 |
| 18:4n-1 | 0,00 | ± 0,00 | 0,09 | ± 0,01 | 0,08 | ± 0,03 |
| 20:0 | 0,12 | ± 0,03 | 0,00 | ± 0,00 | 0,28 | ± 0,05 |
| 20:1n11 | 0,25 | ± 0,13 | 0,06 | ± 0,03 | 0,47 | ± 0,12 |
| 20:1n9 | 1,27 | ± 0,30 | 1,52 | ± 0,06 | 0,75 | ± 0,11 |
| 20:1n7 | 0,37 | ± 0,22 | 0,28 | ± 0,04 | 0,37 | ± 0,05 |
| 20:2n-9 | 0,09 | ± 0,03 | 0,48 | ± 0,03 | 0,08 | ± 0,07 |
| 20:2n-6 | 0,27 | ± 0,11 | 0,23 | ± 0,01 | 0,10 | ± 0,03 |
| 20:3n-9 | 0,05 | ± 0,05 | 0,00 | ± 0,00 | 0,46 | ± 0,02 |
| 20:3n-6 | 0,13 | ± 0,05 | 0,22 | ± 0,01 | 0,20 | ± 0,03 |
| 21:0 | 0,00 | ± 0,00 | 0,19 | ± 0,08 | 0,02 | ± 0,02 |
| 20:4n-6 | 0,87 | ± 0,51 | 0,92 | ± 0,06 | 2,59 | ± 0,27 |
| 20:3n-3 | 0,26 | ± 0,07 | 0,25 | ± 0,02 | 0,30 | ± 0,04 |
| 20:4n-3 | 0,18 | ± 0,03 | 0,89 | ± 0,08 | 0,36 | ± 0,12 |
| 20:5n-3 | 0,58 | ± 0,20 | 3,64 | ± 0,13 | 5,46 | ± 2,11 |
| 22:0 | 0,15 | ± 0,09 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 |
| 22:1n11 | 0,19 | ± 0,09 | 0,04 | ± 0,06 | 0,10 | ± 0,03 |
| 22:1n9 | 0,56 | ± 0,20 | 0,30 | ± 0,38 | 0,11 | ± 0,02 |
| 22:1n7 | 0,33 | ± 0,21 | 0,59 | ± 0,36 | 0,17 | ± 0,02 |
| 22:3n-6 | 0,09 | ± 0,04 | 0,15 | ± 0,01 | 0,31 | ± 0,04 |
| 22:4n-9 | 0,37 | ± 0,18 | 0,00 | ± 0,01 | 0,48 | ± 0,09 |
| 22:4n-6 | 0,14 | ± 0,09 | 0,29 | ± 0,03 | 0,67 | ± 0,09 |
| 22:5 n6 | 0,00 | ± 0,00 | 0,53 | ± 0,03 | 0,11 | ± 0,05 |
| 22:4 n3 | 0,64 | ± 0,22 | 0,01 | ± 0,00 | 0,01 | ± 0,01 |
| 22:5n-3 | 1,11 | ± 0,46 | 3,31 | ± 0,13 | 4,32 | ± 0,75 |
| 22:6n-3 | 1,20 | ± 0,65 | 11,05 | ± 0,18 | 14,47 | ± 1,96 |
| % total AG | 95,5 | | 90,76 | | 97,18 | |
| SAFA | 41,7 | ± 3,37 | 31,5 | ± 2,28 | 32,1 | ± 1,55 |
| MUFA | 47,0 | ± 2,62 | 39,3 | ± 2,55 | 32,6 | ± 2,50 |

| | | | |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| PUFA | 11,3 ± 2,98 | 29,4 ± 0,29 | 35,2 ± 2,68 |
| n-9 | 2,7 ± 1,12 | 23,9 ± 1,82 | 21,2 ± 2,83 |
| n-6 | 4,6 ± 1,44 | 3,4 ± 0,50 | 5,3 ± 0,65 |
| n-3 | 5,4 ± 1,33 | 21,3 ± 0,42 | 27,1 ± 2,07 |
| n-3 HUFA | 4,1 ± 0,10 | 20,0 ± 0,32 | 25,3 ± 1,97 |

Tabla 1.11. Perfil de AG de los hígados de los lenguados alimentados con lacha, perfil de AG de lenguados iniciales y lacha. AG (Ácido graso); X (promedio); DE (Desvío estándar); SAFA (Ácidos grasos saturados); MUFA (Ácidos grasos monoinsaturados); PUFA (Ácidos grasos poliinsaturados).

| AG | Perfil AG lenguados Hígado Inicial | | Perfil AG lenguados Hígado semana 20 | Lacha | | |
|-------------------|------------------------------------|--------|--------------------------------------|--------|--------------|--------|
| | X | DE | X | DE | X | DE |
| 12:0 | 0,11 | ± 0,05 | 0,10 | ± 0,03 | 0,19 | ± 0,11 |
| 14:1 | 0,17 | ± 0,04 | 0,13 | ± 0,02 | 0,36 | ± 0,23 |
| 15:0 | 0,96 | ± 0,19 | 0,53 | ± 0,05 | 1,36 | ± 0,61 |
| 16:iso | 0,06 | ± 0,01 | 0,09 | ± 0,06 | 0,13 | ± 0,06 |
| 16:aiso | 0,18 | ± 0,03 | 0,01 | ± 0,01 | 0,16 | ± 0,06 |
| 16:0 | 29,85 | ± 1,99 | 22,94 | ± 1,10 | 27,08 | ± 6,56 |
| 16:1n-7 | 12,98 | ± 2,14 | 8,01 | ± 6,94 | 9,11 | ± 2,06 |
| 16:1n-5 | 0,11 | ± 0,25 | 0,36 | ± 0,17 | 0,25 | ± 0,10 |
| 16:2 | 1,40 | ± 0,14 | 0,68 | ± 0,17 | 1,70 | ± 0,34 |
| 17:0 | 0,83 | ± 0,17 | 0,15 | ± 0,26 | 0,91 | ± 0,50 |
| 16:3n-4 | 1,23 | ± 0,25 | 0,67 | ± 0,52 | 1,70 | ± 0,59 |
| 17:1 | 0,06 | ± 0,13 | 0,25 | ± 0,03 | 0,36 | ± 0,12 |
| 16:4n-1 | 0,26 | ± 0,04 | 0,00 | ± 0,00 | 0,15 | ± 0,08 |
| 16:4n-3 | 0,11 | ± 0,01 | 0,03 | ± 0,02 | 0,25 | ± 0,16 |
| 18:0 | 4,75 | ± 0,40 | 3,46 | ± 0,45 | 6,50 | ± 2,55 |
| 18:1n-9 | 22,62 | ± 3,31 | 24,23 | ± 1,19 | 14,69 | ± 3,61 |
| 18:1n-7 | 7,71 | ± 0,78 | 4,10 | ± 0,29 | 3,31 | ± 1,22 |
| 18:2n-9 | 0,53 | ± 0,12 | 0,18 | ± 0,01 | 0,18 | ± 0,07 |
| 18:2n-6 | 1,06 | ± 0,30 | 0,66 | ± 0,05 | 1,19 | ± 0,20 |
| 18:3n-9 | 0,07 | ± 0,05 | 0,02 | ± 0,00 | 0,04 | ± 0,04 |
| 18:3n-6 | 0,17 | ± 0,08 | 0,18 | ± 0,02 | 0,27 | ± 0,09 |
| 18:3n-3 | 0,87 | ± 0,15 | 0,25 | ± 0,03 | 0,80 | ± 0,44 |
| 18:4n-3 | 0,25 | ± 0,04 | 0,20 | ± 0,03 | 1,22 | ± 0,92 |
| 18:4n-1 | 0,00 | ± 0,00 | 0,03 | ± 0,00 | 0,16 | ± 0,07 |
| 20:0 | 0,12 | ± 0,03 | 0,00 | ± 0,00 | 1,19 | ± 0,36 |
| 20:1n11 | 0,25 | ± 0,13 | 0,13 | ± 0,01 | 0,15 | ± 0,15 |
| 20:1n9 | 1,27 | ± 0,30 | 1,18 | ± 0,18 | 2,82 | ± 0,85 |
| 20:1n7 | 0,37 | ± 0,22 | 0,25 | ± 0,05 | 0,38 | ± 0,09 |
| 20:2n-9 | 0,09 | ± 0,03 | 0,12 | ± 0,01 | 0,06 | ± 0,03 |
| 20:2n-6 | 0,27 | ± 0,11 | 0,20 | ± 0,01 | 0,55 | ± 0,22 |
| 20:3n-9 | 0,05 | ± 0,05 | 0,00 | ± 0,00 | 0,29 | ± 0,08 |
| 20:3n-6 | 0,13 | ± 0,05 | 0,11 | ± 0,01 | 0,26 | ± 0,04 |
| 21:0 | 0,00 | ± 0,00 | 0,11 | ± 0,02 | 0,04 | ± 0,03 |
| 20:4n-6 | 0,87 | ± 0,51 | 1,24 | ± 0,01 | 0,63 | ± 0,32 |
| 20:3n-3 | 0,26 | ± 0,07 | 0,21 | ± 0,00 | 0,17 | ± 0,09 |
| 20:4n-3 | 0,18 | ± 0,03 | 0,32 | ± 0,01 | 0,70 | ± 0,40 |
| 20:5n-3 | 0,58 | ± 0,20 | 1,93 | ± 0,29 | 3,70 | ± 2,92 |
| 22:0 | 0,15 | ± 0,09 | 0,00 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 |
| 22:1n11 | 0,19 | ± 0,09 | 0,07 | ± 0,06 | 0,07 | ± 0,05 |
| 22:1n9 | 0,56 | ± 0,20 | 0,43 | ± 0,29 | 0,50 | ± 0,08 |
| 22:1n7 | 0,33 | ± 0,21 | 0,32 | ± 0,25 | 0,16 | ± 0,08 |
| 22:3n-6 | 0,09 | ± 0,04 | 0,12 | ± 0,07 | 0,32 | ± 0,17 |
| 22:4n-9 | 0,37 | ± 0,18 | 0,00 | ± 0,00 | 0,13 | ± 0,07 |
| 22:4n-6 | 0,14 | ± 0,09 | 0,37 | ± 0,04 | 0,27 | ± 0,22 |
| 22:5 n6 | 0,00 | ± 0,00 | 0,44 | ± 0,00 | 0,16 | ± 0,09 |
| 22:4 n3 | 0,64 | ± 0,22 | 0,01 | ± 0,00 | 0,00 | ± 0,00 |
| 22:5n-3 | 1,11 | ± 0,46 | 3,14 | ± 0,11 | 1,00 | ± 0,69 |
| 22:6n-3 | 1,20 | ± 0,65 | 9,46 | ± 0,32 | 5,42 | ± 3,42 |
| % total AG | 95,5 | | 87,41 | | 91,10 | |
| SAFA | 41,7 | ± 3,37 | 32,6 | ± 2,13 | 46,5 | ± 9,33 |
| MUFA | 47,0 | ± 2,62 | 46,1 | ± 2,19 | 32,2 | ± 5,43 |

| | | | |
|-----------------|-------------|-------------|--------------|
| PUFA | 11,3 ± 2,98 | 21,5 ± 0,16 | 21,3 ± 10,06 |
| n-9 | 2,7 ± 1,12 | 31,7 ± 5,79 | 18,7 ± 4,34 |
| n-6 | 4,6 ± 1,44 | 3,3 ± 0,04 | 3,7 ± 0,91 |
| n-3 | 5,4 ± 1,33 | 16,1 ± 0,53 | 13,3 ± 8,62 |
| n-3 HUFA | 4,1 ± 0,10 | 15,1 ± 0,69 | 11,0 ± 7,32 |

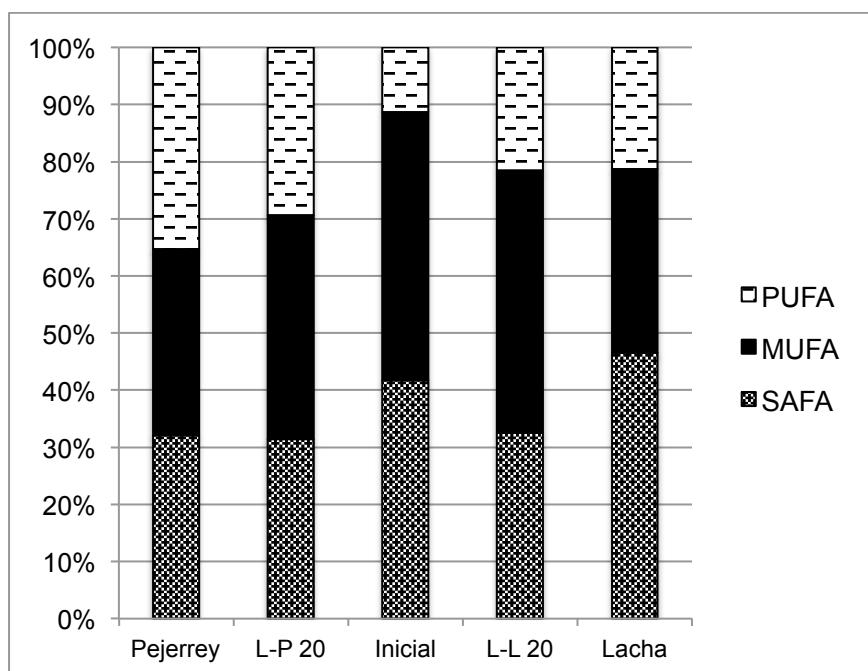


Figura 1.8. Ácidos grasos saturados (SAFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) durante el experimento de alimentación controlada. L-P 20, (Hígado de lenguados alimentados con pejerrey semana 20). L-L 20 (Hígado de lenguados alimentados con lacha semana 20).

El perfil de AG inicial de los hígados de los lenguados de Laguna fue el que presentó menores valores de PUFA y en cuanto a las proporciones entre SAFA/MUFA/PUFA el inicial fue el más distinto a todos (Fig. 1.8).

En la semana 20, los hígados de los lenguados alimentados con pejerrey se asemejaron más al perfil de AG del pejerrey que el perfil de AG de hígado de lenguados alimentados con lacha con respecto a la lacha.

Como se mencionó más arriba, el perfil de AG de la lacha presenta más SAFA que el de pejerrey, sin embargo los niveles de SAFA alcanzados por ambos grupos de

lenguados luego de 20 semanas (en el hígado) fue similar 31,1/32,% para pejerrey y lacha respectivamente. En cuanto a los valores de MUFA, pejerrey y lacha muestran niveles parecidos (32,6/32,2%) respectivamente, sin embargo el perfil de hígados en la semana 20 para lacha (46,6%) fue superior al de pejerrey (39,2%). Con respecto a los PUFA, la lacha tiene valores inferiores (21,3%) al pejerrey (35,2%), y concordantemente los valores de los perfiles de hígados en la semana 20 para lenguados alimentados con lacha fueron inferiores (21,5%) que para los alimentados con pejerrey (29,4%), asemejándose mucho más en el grupo lacha a su presa, que en el grupo pejerrey a su presa.

El 18:2n6 tuvo un comportamiento similar en el músculo con piel y en el hígado. En las presas, este ácido graso fue similar (1,1 y 1,2%) y también lo fue en ambos grupos (0,67 y 0,66%) para pejerrey y lacha respectivamente. El 18:3n3 fue menor en lacha (0,80%) que en pejerrey (1,1%) y fue concordante con lo encontrado en los hígados de los lenguados con lacha (0,25%) y con pejerrey (0,46%). Para el 20:4n6, los hígados se comportaron diferente que el músculo con piel, si bien el pejerrey como se mencionó antes tiene casi 4 veces más cantidad de este AG (2,6%) que la lacha (0,63%), en la semana 20 lo hígados de los lenguados alimentados con lacha (1,24%) presentaron más que los lenguados alimentados con pejerrey (0,92%), niveles muy inferiores a los encontrados en el músculo con piel (aproximadamente 4%).

El 20:5n3 fue mayor en el pejerrey (5,46%) que en la lacha (3,70%), y concordamente fue mayor en el hígado (3,64%) de los alimentados con pejerrey que con lacha (1,93%), no alcanzando en ningún caso el valor de su presa, siendo siempre inferior. El 22:6n3 también fue mayor en el pejerrey (14,5%) que en la lacha (5,42%) y en los hígados también fue mayor en los alimentados con pejerrey (11,1%) que en la lacha (9,5%), pero en este caso para el hígado de los lenguados alimentados con pejerrey no alcanzó los niveles encontrados en su presa, pero en el caso de la lacha fue muy superior (9,5% vs 5,42%). Este comportamiento, del 22:6n3 comparado con el músculo con piel en la semana 20 presenta diferencias, en donde en los lenguados alimentados con pejerrey superó al de su presa (18,8% vs 14,5%) y en la lacha también lo superó pero aún más (12,9% vs 5,42%).

Si bien los datos de AG son muy extensos, se comentan los resultados para SAFA, MUFA y PUFA y la de 5 ácidos grasos ampliamente discutidos en la literatura (18:2n6; 18:3n3, 20:4n6; 20:5n3 y 22:6n3). La descripción de cada uno resultaría excesivamente extensa y escapa a los buscados en este estudio. Lo que se si se quiere

ejemplificar es que estas diferencias en los comportamientos de los AG tendrán profundas implicancias en el cálculo de los coeficientes de calibración, así como también el subconjunto de AG seleccionado para correr en el modelo. Los AG dentro de un mismo perfil no constituyen variables independientes, sino que dependientes unas de otras, subiendo algunas pero disminuyendo a la vez otras. La ventaja del uso del QFASA radica quizá en que se toman muchos ácidos grasos a la vez, lo que hace un análisis más holístico en una misma observación. Será entonces el cruce de muchas variables, como por ejemplo el subconjunto de AG seleccionado, el tejido de reserva, las presas ofrecidas, los coeficientes de calibración, lo que determine (durante el proceso de validación) qué combinación será la que mejor refleje la dieta de una especie.

La Tabla 1.12 muestra los coeficientes de calibración calculados para los lenguados alimentados con pejerrey y con lacha tanto en la semana 5, 12 y 20, cada uno calculado con la presa consumida. También muestra los coeficientes calculados para el hígado en la semana 20 con su respectiva presa. Cabe destacar, que también se hicieron promedios de coeficientes, por ejemplo, en la semana 20 se promediaron los coeficientes de calibración para ambos grupos de alimentación, a fin de hacer las corridas correspondientes del modelo y observar si mejoraba el “output” del mismo.

Tabla 1.12. Coeficientes de calibración para 36 AG de ambos grupos de lenguados (alimentados con pejerrey y lacha), en la semana 5, 12 y 20 para músculo con piel y en la semana 20 para hígado.

| Semana/ AG | Pejerrey | | | | Lacha | | | |
|--|-----------------|------|--------|------|-----------------|------|--------|------|
| | Músculo c/ piel | | Hígado | | Músculo c/ piel | | Hígado | |
| | 5 | 12 | 20 | 20 | 5 | 12 | 20 | 20 |
| 12:0 | - | 1,61 | 0,22 | 0,50 | - | 2,46 | 0,43 | 0,36 |
| 14:0 | 0,98 | 0,80 | 0,78 | 1,59 | 0,65 | 0,40 | 0,33 | 0,57 |
| 14:1 | 1,62 | 0,84 | 0,63 | 0,74 | 0,87 | 0,65 | 0,54 | 0,79 |
| 15:0 | 1,05 | 0,89 | 0,55 | 0,56 | 1,15 | 0,73 | 0,38 | 0,75 |
| 16:iso | 2,05 | 1,81 | 0,46 | 0,21 | 1,85 | 1,03 | 0,35 | 0,41 |
| 16:0 | 1,62 | 1,45 | 1,03 | 1,05 | 1,36 | 1,11 | 1,06 | 0,87 |
| 16:1n-7 | 0,81 | 0,81 | 0,75 | 1,19 | 0,81 | 0,65 | 0,49 | 1,03 |
| 16:1n-5 | 1,38 | 1,05 | 0,97 | 1,78 | 1,25 | 0,99 | 1,04 | 1,26 |
| 16:2 | 2,48 | 2,13 | 1,66 | 1,64 | 0,79 | 0,72 | 0,65 | 1,15 |
| 17:0 | 1,02 | 0,84 | 0,59 | 0,12 | 1,97 | 1,00 | 0,98 | 0,00 |
| 16:3n-4 | 0,92 | 0,85 | 0,74 | 0,52 | 0,67 | 0,57 | 0,62 | 0,83 |
| 17:1 | 0,82 | 0,68 | 0,55 | 0,62 | 0,86 | 0,68 | 0,62 | 0,84 |
| 16:4n-3 | 2,22 | 3,89 | 4,32 | 0,31 | 0,85 | 1,67 | 2,59 | 0,20 |
| 18:0 | 2,52 | 2,20 | 1,43 | 0,76 | 2,10 | 1,49 | 1,48 | 0,58 |
| 18:1n-9 | 1,05 | 1,04 | 0,78 | 1,29 | 1,29 | 1,34 | 0,90 | 1,44 |
| 18:1n-7 | 1,11 | 1,03 | 0,79 | 1,08 | 1,13 | 1,02 | 0,81 | 1,26 |
| 18:2n-6 | 2,93 | 4,29 | 4,29 | 2,10 | 0,91 | 1,36 | 1,50 | 0,56 |
| 18:3n-6 | 0,48 | 0,54 | 0,64 | 0,66 | 0,65 | 0,91 | 0,61 | 1,25 |
| 18:3n-3 | 0,39 | 0,34 | 0,47 | 0,24 | 0,37 | 0,57 | 0,62 | 0,65 |
| 18:4n-3 | 0,13 | 0,17 | 0,46 | 0,29 | 0,21 | 0,46 | 0,42 | 0,72 |
| 18:4n-1 | 10,10 | 7,29 | 1,35 | 0,47 | 4,09 | 2,82 | 1,65 | 0,58 |
| 20:0 | 2,05 | 1,52 | 1,01 | 0,00 | 0,71 | 0,54 | 0,43 | 0,00 |
| 20:1 | 3,08 | 2,50 | 0,75 | 1,00 | 2,14 | 2,42 | 0,43 | 0,58 |
| 20:2n-9 | 8,44 | 0,02 | 0,53 | 3,05 | 0,50 | 0,02 | 0,01 | 0,02 |
| 20:2n-6 | 1,56 | 1,63 | 1,10 | 2,14 | 0,61 | 0,55 | 0,45 | 0,42 |
| 20:3n-6 | 1,67 | 1,45 | 1,18 | 0,58 | 1,20 | 1,64 | 1,51 | 0,85 |
| 20:4n-6 | 0,32 | 0,87 | 1,72 | 0,48 | 1,40 | 4,91 | 8,49 | 1,51 |
| 20:3n-3 | 0,30 | 0,46 | 0,63 | 0,71 | 0,50 | 1,02 | 0,86 | 1,70 |
| 20:4n-3 | 0,18 | 0,63 | 1,17 | 1,18 | 0,24 | 0,47 | 0,72 | 1,33 |
| 20:5n-3 | 0,09 | 0,31 | 1,31 | 0,63 | 0,18 | 0,59 | 1,40 | 1,17 |
| 22:1 | 6,14 | 4,63 | 1,30 | 2,21 | 4,16 | 3,30 | 0,84 | 1,36 |
| 22:3n-6 | 0,72 | 0,58 | 0,78 | 0,39 | 0,54 | 0,83 | 1,97 | 0,57 |
| 22:4n-6 | 0,16 | 0,81 | 1,71 | 0,56 | 0,61 | 3,15 | 6,40 | 1,23 |
| 22:5 n6 | 0,23 | 0,08 | 0,91 | 4,80 | 0,41 | 0,13 | 0,59 | 3,19 |
| 22:5n-3 | 0,08 | 0,33 | 0,93 | 0,74 | 0,72 | 1,90 | 3,13 | 3,60 |
| 22:6n-3 | 0,21 | 0,39 | 1,31 | 0,66 | 0,70 | 1,71 | 3,54 | 2,28 |
| Número de CC (0,9<CC _x >1,1) | 5 | 3 | 5 | 3 | 1 | 6 | 4 | 1 |
| Número de CC (CC _x >2) | 10 | 7 | 2 | 5 | 4 | 6 | 5 | 3 |

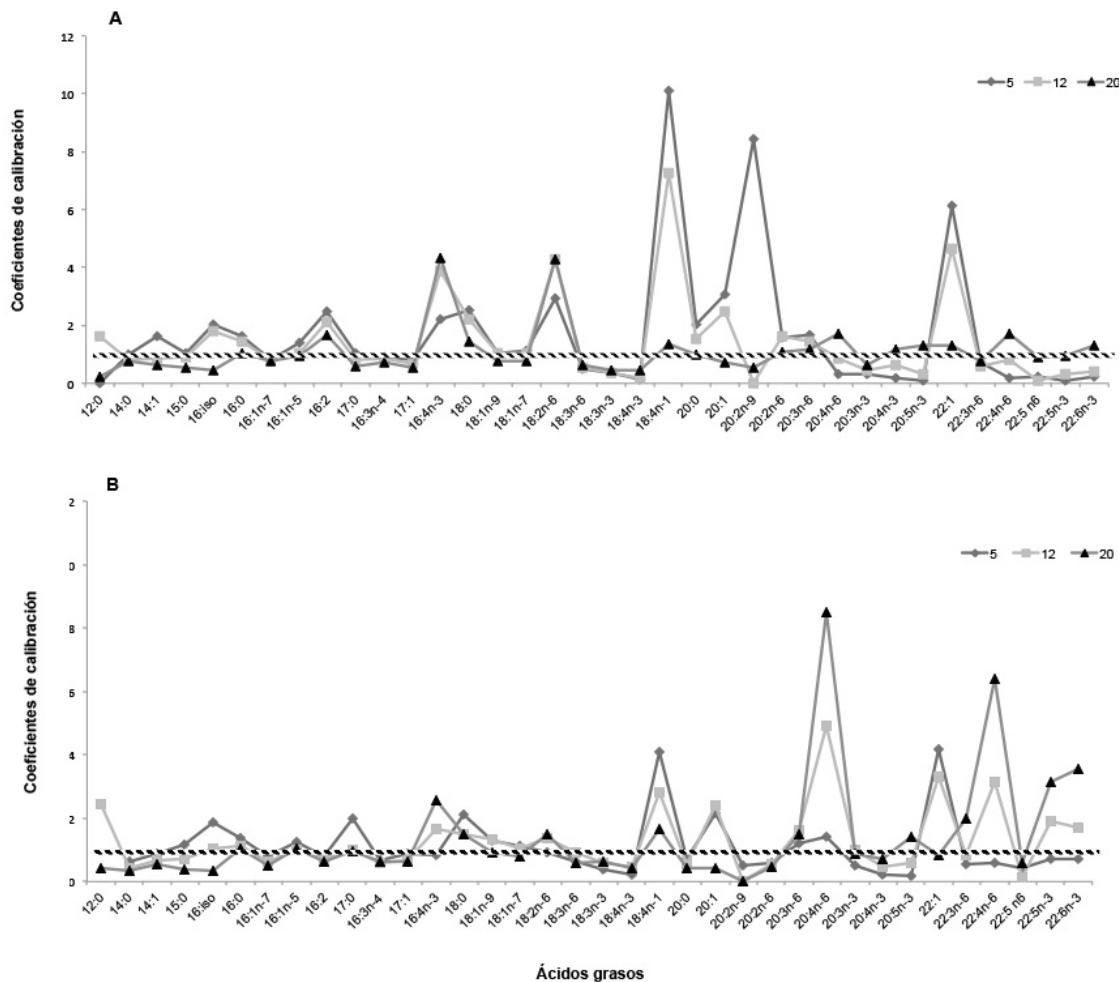


Figura 1.9. Coeficientes de calibración obtenidos a partir de músculos con piel en la semana 5, 12 y 20. A) Lenguados alimentados con pejerrey B) Lenguados alimentados con lacha.

Un coeficiente de calibración para un AG_x cuyo valor sea 1 o se aproxime a 1 significaría que éste AG_x se encuentra en la misma proporción tanto en la presa como en el tejido del predador (en este caso músculo con piel o hígado) lo que se podría interpretar como que estos tejidos “incorporaron” la misma cantidad de AG ingerida en su dieta. Debido a que el perfil de AG de los reservorios de energía de una especie se ve influida por la dieta, pero nunca llegará a reflejar completamente ésta, los coeficientes de calibración raramente serán 1 para todos los AG. En este trabajo, se busca justamente observar el comportamiento de los AG para en instancias posteriores saber a qué nos enfrentamos cuando los incorporamos en los subconjuntos de AG para correr en el modelo.

Como era de esperar, los resultados de los CC obtenidos durante la experiencia de alimentación contralada no presentan todos un patrón parecido, ni terminan en la semana 20 estrictamente en el valor 1 (Tabla 1.12 y Fig. 1.9).

Para hacer una interpretación y lectura de estos resultados se propusieron contabilizar aquellos CC que fuesen “1” tomando como referencia arbitraria un intervalo ± 0.1 , ($0.9 < CC_x < 1.1$). De la misma forma, se contabilizó el número de CC que fueran > 2.0 . Se puede observar que de los 36 AG analizados para obtener los CC, fueron relativamente pocos (1 a 6) los que se encontraron en un margen ± 0.1 .

El grupo de lenguados alimentados con pejerrey fue más parejo, contando en la semana 20 (de músculo con piel) con dos AG dietarios (22:5n6 y 22:5n3) entre ellos, siendo justamente, también en este grupo el que contó con menor número de CC > 2.0 . Esto, sumado al hecho de que los CC > 2.0 muestran una tendencia decreciente conforme aumenta el tiempo en este grupo y en este tejido (10 / 7 / 2) hace suponer que con la presa pejerrey en el músculo con piel se observan claramente el efecto de la dieta sobre el tejido. Referido específicamente a qué AG están en este conteo, destaca entre los CC cercanos a 1, que la mayoría son no dietarios, principalmente saturados (14:0; 15:0; 16:0 y 17:0) y monoinsaturados. En el grupo de CC > 2.0 son saturados (sólo 18:0) y principalmente poliinsaturados de menos de 20 carbonos. En este grupo, en la semana 5 se observan los CC más elevados (10,1; 8,4 y 6,1), que luego irán decreciendo paulatinamente. En los lenguados alimentados con pejerrey en la semana 20, el hígado comparado con el músculo con piel, muestra menos CC cercanos a 1 (3 vs 5) y más CC > 2.0 (5 vs 2), sugiriendo numéricamente quizá que este tejido refleje menos la dieta, ya sea porque no depositan allí sus lípidos o por el involucramiento de este órgano en otros mecanismos fisiológicos. Respecto al comportamiento de los 5 AG discutidos anteriormente (18:2n6; 18:3n3; 20:4n6; 20:5n3 y 22:5n3) cabe destacar con respecto al 18:2n6 que siempre fue > 2.0 en ambos tejidos, siendo en la semana 12 y 20 (de músculo con piel) en la que más se alejó. El 18:3n3 siempre fue menor a 0,5 en ambos tejidos. El 20:4n6 se fue incrementando de la semana 5 a la 20 en el músculo con piel (0,32 a 1,72) y estuvo en torno a 0,5 en el hígado. El 20:5n3 y el 22:6n3 también mostraron un aumento desde la semana 5 a la 20 (0,1 a 1,3), quedando en valores intermedios (0,6) en el hígado.

Respecto a la tendencia a valores cercanos a “1”, los CC del grupo de lenguados alimentados con lacha, fueron más variados y no se observaron tendencias marcadas. Si bien el número de CC cercanos a “1” aumentó de 1 a 4 de la semana 5 a la 20 en el

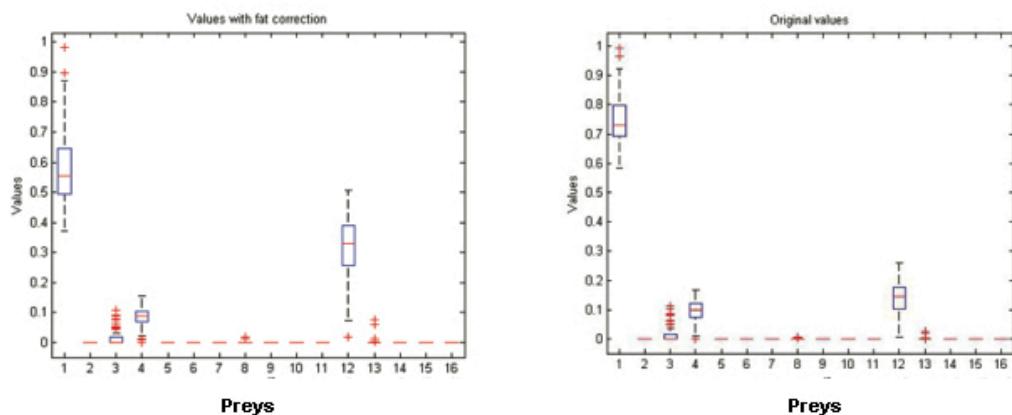
músculo con piel, en la semana intermedia (12) hubieron más casos (6). Del mismo modo, el número de CC > 2,0, fue aumentando (en vez de descender) como en el otro grupo. El hígado en este grupo mostró sólo un CC cercano a 1 y 3 CC > 2,0. El 18:2n6 a diferencia del otro grupo, fue relativamente constante y se mantuvo en torno a 1,5 en el músculo con piel y en el hígado fue de 0,6. El 18:3n3 mostró una tendencia parecida con el otro grupo, siendo relativamente constante durante todo el experimento en ambos tejidos. El 20:4n6 mostró una tendencia acumulativa (como en el otro grupo) pero con valores mucho más altos, llegando en la semana 20 a 8,5, mostrando la misma tendencia acumulativa de este AG, pero al tener mucho menos cantidad la lacha que el pejerrey, esta tendencia es mucho más notoria. En el hígado fue tres veces mayor en el grupo de lacha que en el de pejerrey (1,5 vs 0,5). El 20:5n3 y el 22:6n3 también mostraron una tendencia acumulativa en el músculo con piel, siendo mucho más notoria en el 22:6n3 que en 20:5n3, pasando en el último de 0,2 a 1,4 y en el 22:6n3 de 0,7 a 3,5. En el hígado también fue alto (2,3) siendo casi 3,5 veces más alto que para el hígado del grupo pejerrey.

Algunos AG como es el caso del 18:4n1 o 20:2n9 aparecen naturalmente en bajas proporciones (generalmente <0.5% del total de AG tanto en lenguados como en las presas), el desvío relativo estándar de estos AG traza, muchas veces hacen que los CC se magnifiquen (Figura 1.9) y que no necesariamente tengan un significado biológico.

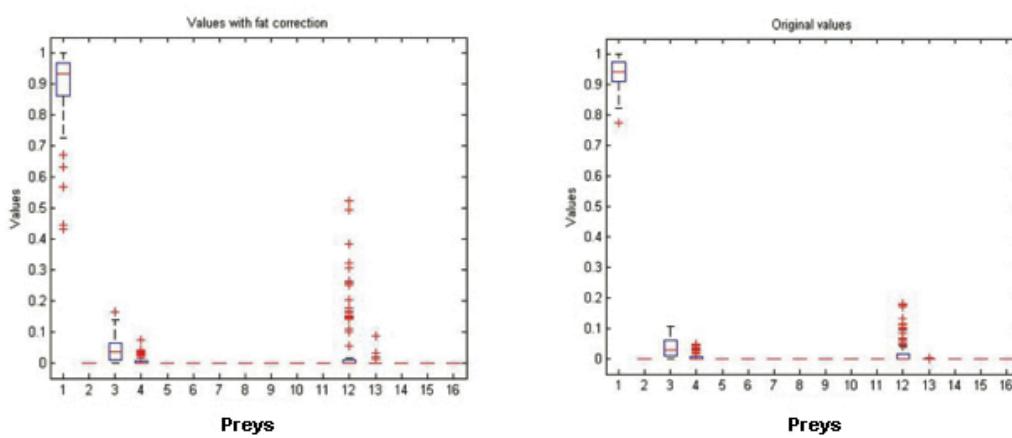
1.3.3. Validación del modelo QFASA para *Paralichthys orbignyanus*

Se realizaron en total 112 corridas del modelo QFASA durante el proceso de validación. Se analizaron por separado los 7 subconjuntos de AG propuestos (Tabla 1.1), tomando como predador el músculo dorsal con piel y el hígado de los lenguados alimentados con lacha y pejerrey de la semana 20. Se realizaron corridas sin coeficientes de calibración, con el coeficiente de calibración obtenido para cada grupo (pejerrey y lacha) y con el coeficiente de calibración promediado de ambos grupos, siempre considerando los datos de AG de la semana 20.

La Figura 1.10 muestra un ejemplo de las salidas gráficas al finalizar cada corrida del modelo. También se obtienen resultados numéricos luego de cada corrida, con lo que se confeccionó la Tabla 1.13.



Subconjunto AG A



Subconjunto AG B

Figura 1.10. Resultados gráficos mostrados luego de dos corridas en Matlab 7.0 según el script adaptado al modelo QFASA para *P. orbignyanus*. Se muestran los resultados de corridas tomando como predador el músculo con piel de lenguados alimentados con pejerrey (semana 20), ensayando el subconjunto de AG (A y B). El primer ejemplo es para le subconjunto A sin coeficientes de calibración y el segundo ejemplo es para el subconjunto de AG (B) con coeficientes de pejerrey.

La Tabla 1.13 muestra el porcentaje de la dieta real consumida y estimada por el modelo QFASA en cada corrida. Si el modelo estimara “correctamente”, el resultado sería 100% de ítem pejerrey para los lenguados alimentados con pejerrey y 100% del ítem lacha para los alimentados con esta presa. Se utilizó músculo dorsal con piel e hígado (semana 20) como tejido de reserva del predador, tanto de lenguados alimentados con pejerrey como con lacha para los 7 subconjuntos de AG propuestos (Tabla 1.1), y para éstos 28 grupos se corrió el modelo sin CC, con CC pejerrey, con CC lacha y con CC promedio de ambos grupos.

A modo de ejemplo, si se toma el músculo dorsal con piel (semana 20) de los lenguados alimentados con pejerrey como predador, se considera el subconjunto de AG A (Tabla 1.1), y no se corrige el perfil de AG del predador (sin CC) entonces el modelo estima que esos peces comieron $49,0 \pm 5,4\%$ de pejerrey (columna 1, fila 1), el otro 51,0% pertenece a otros items no mostrados en la tabla. El resultado de la columna 1, fila 2, corresponde a las mismas condiciones de partida a diferencia de que el perfil de AG del predador se corrigió con los CC de pejerrey de la semana 20, en esta instancia el modelo estima que los lenguados comieron $94,9 \pm 2,9\%$ de pejerrey.

Tabla 1.13. Estimación del porcentaje de la presa consumida durante los experimentos de alimentación controlada (%±DE) durante el proceso de validación experimental. Las corridas se hicieron tomando en cuenta los tejidos colectados en la semana 20. Se usó tanto músculo con piel e hígado como lugares de reserva, así como los 7 subconjuntos de AG propuestos.

| Porcentaje estimado de la dieta real consumida | | | | | | | | | | | | | | | Fila | |
|--|-------------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----|
| Músculo dorsal con piel | | Sub AG A | | Sub AG B | | Sub AG C | | Sub AG D | | Sub AG E | | Sub AG F | | Sub AG G | | |
| Lenguados alimentados con pejerrey (Perfil AG semana 20) | Sin CC | 49,0 | ± 5,4 | 77,3 | ± 12,3 | 29,9 | ± 13,8 | 0,0 | ± 0,0 | 34,4 | ± 5,9 | 56,1 | ± 7,1 | 52,7 | ± 7,4 | 1 |
| | CC Pejerrey | 94,9 | ± 2,9 | 98,7 | ± 2,5 | 94,7 | ± 5,8 | 87,5 | ± 10,7 | 97,8 | ± 2,2 | 88,8 | ± 3,5 | 88,3 | ± 3,7 | 2 |
| | CC Lacha | 5,2 | ± 7,1 | 42,6 | ± 8,0 | 4,0 | ± 5,7 | 42,2 | ± 10,1 | 19,5 | ± 14,1 | 5,6 | ± 5,9 | 4,3 | ± 5,4 | 3 |
| | Promedio CC | 45,6 | ± 5,6 | 80,8 | ± 6,5 | 57,7 | ± 5,1 | 74,2 | ± 11,5 | 84,4 | ± 4,5 | 46,5 | ± 5,6 | 46,5 | ± 5,8 | 4 |
| Lenguados alimentados con lacha (Perfil de AG semana 20) | Sin CC | 1,2 | ± 1,4 | - | ± - | - | ± - | 13,1 | ± 6,0 | 2,3 | ± 1,2 | 0,3 | ± 0,9 | 0,3 | ± 0,9 | 5 |
| | CC Pejerrey | 73,7 | ± 17,4 | 81,1 | ± 10,2 | 89,7 | ± 12,9 | 73,6 | ± 18,9 | 75,6 | ± 13,9 | 54,5 | ± 20,7 | 58,7 | ± 19,1 | 6 |
| | CC Lacha | 64,5 | ± 15,5 | 80,5 | ± 4,6 | 88,5 | ± 13,2 | 73,8 | ± 19,3 | 78,8 | ± 13,5 | 57,7 | ± 19,7 | 54,6 | ± 19,1 | 7 |
| | Promedio CC | 41,8 | ± 10,1 | 38,6 | ± 4,9 | 55,4 | ± 4,6 | 50,5 | ± 13,9 | 23,4 | ± 7,1 | 39,0 | ± 8,3 | 39,5 | ± 9,2 | 8 |
| Hígado | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lenguados alimentados con pejerrey (Perfil AG semana 20) | Sin CC | 64,6 | ± 4,4 | 88,2 | ± 14,0 | 5,9 | ± 8,7 | 0,2 | ± 1,3 | 79,5 | ± 10,6 | 59,0 | ± 4,2 | 56,8 | ± 4,5 | 9 |
| | CC Pejerrey | 96,1 | ± 2,6 | 99,0 | ± 2,2 | 94,3 | ± 6,0 | 87,5 | ± 8,8 | 97,6 | ± 3,3 | 89,5 | ± 2,9 | 88,4 | ± 3,3 | 10 |
| | CC Lacha | 2,4 | ± 4,9 | 30,3 | ± 12,1 | - | ± - | - | ± - | 44,8 | ± 11,1 | 0,5 | ± 1,8 | 1,2 | ± 3,6 | 11 |
| | Promedio CC | 42,1 | ± 5,9 | 75,7 | ± 5,8 | 46,9 | ± 7,8 | 32,3 | ± 12,7 | 83,7 | ± 4,3 | 30,6 | ± 5,9 | 34,1 | ± 5,7 | 12 |
| Lenguados alimentados con lacha (Perfil de AG semana 20) | Sin CC | 20,0 | ± 2,2 | 10,0 | ± 2,1 | 48,4 | ± 10,0 | 70,6 | ± 20,5 | 25,4 | ± 5,9 | 17,4 | ± 2,6 | 18,2 | ± 3,2 | 13 |
| | CC Pejerrey | 4,4 | ± 1,9 | 9,2 | ± 1,9 | 21,7 | ± 6,6 | 17,4 | ± 18,4 | 10,7 | ± 4,0 | 0,4 | ± 0,5 | 1,1 | ± 0,8 | 14 |
| | CC Lacha | 79,6 | ± 9,7 | 70,4 | ± 16,9 | 86,5 | ± 10,6 | 80,1 | ± 13,8 | 78,6 | ± 11,2 | 70,7 | ± 14,4 | 71,9 | ± 14,2 | 15 |
| | Promedio CC | 38,9 | ± 5,7 | 31,6 | ± 10,6 | 60,3 | ± 6,6 | 54,1 | ± 19,0 | 30,2 | ± 3,8 | 28,3 | ± 4,9 | 26,2 | ± 3,8 | 16 |

La Tabla 1.13 presenta casi toda la gama de valores posibles para la estimación (0 a 100%), presentando una media y una mediana muy parecidas $49,4 \pm 31,4$ y 49,8 respectivamente. En los casos en donde no hay valor en la tabla, significa que durante la ejecución del modelo no se encontró ningún resultado (luego de las iteraciones programadas en la minimización, no se encontró ningún mínimo).

Se comentarán los resultados según: tejido de reserva (músculo dorsal con piel o hígado), según el subconjunto de AG seleccionado (A-G) y según el ítem presa utilizado (pejerrey o lacha).

1.3.4 Tejido de reserva (músculo con piel vs hígado)

Dentro del grupo lenguados alimentados con pejerrey, cuando se comparó el % de estimación entre el músculo con piel y el hígado (ambos con CC pejerrey; Tabla 1.13, fila 2 vs 10) no se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$), no mostrando diferencias en el reflejo entre estos dos tejidos. En ambos casos, el porcentaje de estimación fue mayor (87,5 a 99,0%) cuando se corrigió el tejido predador con el CC de pejerrey, a los otros tres casos. De éstos, cuando se corrió el modelo sin CC, los resultados fueron dispares entre subconjuntos de AG (fila 1 vs fila 9), mostrando una tendencia parecida entre músculo con piel e hígado, siendo siempre superior el subconjunto B (77,3 y 88,2%) para músculo e hígado respectivamente. En el caso de corregir el tejido con el CC de la otra presa (lacha) los resultados fueron inferiores, superando raramente el 10% (fila 3 vs 11), con 2 ausencias en resultados. Destaca que el subconjunto B fue superior en ambos casos (42,6 y 30,3%). Utilizando el promedio de los dos CC, los resultados fueron intermedios (30,6 a 84,4%), siendo siempre superior la estimación en el músculo que en el hígado, y también superior en el subconjunto B (fila 4 y 12).

Dentro del grupo de lenguados alimentados con lacha en general las estimaciones siempre fueron inferiores al grupo alimentado con pejerrey. Cuando se comparó el % de estimación entre el músculo con piel y el hígado (ambos con CC lacha, Tabla 1.13, fila 7 vs 15) no se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$), no mostrando diferencias en el reflejo entre estos dos tejidos, siendo el porcentaje de estimación alto (54,6 a 88,5%). A diferencia del grupo alimentado con pejerrey, para el músculo con piel en los lenguados alimentados con lacha las estimaciones realizadas con CC

pejerrey fueron siempre mejores que cuando se corrigió por el CC de la presa consumida lacha (Tabla 1.13, fila 6 vs 7). Esto no ocurrió en el caso del hígado en donde las estimaciones fueron superiores cuando se corrigió con el CC de la presa consumida (lacha, Tabla 1.13, fila 15) que con el CC de pejerrey (Tabla 1.13, fila 14), siendo en este caso las diferencias muy notorias. Cuando se corrió el modelo sin CC (Tabla 1.13, fila 5 vs 13) el porcentaje de estimación fue bajo, solo superando el 25% en dos ocasiones, habiendo dos casos en donde no hubo estimación. Utilizando el promedio de los dos CC, los resultados fueron intermedios (23,4 a 60,3%) e inferiores a los del otro grupo.

En suma, las mejores estimaciones se obtuvieron cuando el tejido de reserva del predador se corrigió con el CC de pejerrey en ambos grupos en músculo dorsal con piel. En el hígado, si bien el CC de pejerrey fue mejor en su grupo, no fue tan bueno en estimar la dieta de los lenguados alimentados con lacha.

Cuando se corrigió el tejido del predador con CC pejerrey para los lenguados alimentados con pejerrey el modelo siempre “acertó” más del 89% sin importar el subconjunto de AG seleccionado (Tabla 1.13, fila 2). El porcentaje de aciertos corrigiendo el tejido del predador con CC lacha siempre fue inferior que cuando se corrigió por el CC pejerrey.

1.3.5 Subconjuntos de AG

De los subconjuntos de AG utilizados en las corridas (A-G, Tabla 1.1) en la Tabla 1.13, fila 1 a la 16 se observa que C, B, D y E fueron los que obtuvieron valores superiores, siendo 6, 5, 3 y 2 veces superiores respectivamente. El subconjunto B, fue el que mostró valores superiores, cercanos al 100% de estimación correcta (98,7 y 99,0%, Tabla 1.13, fila 2 y 10) en el grupo de lenguados alimentados con pejerrey y corregidos con CC pejerrey. También resultó el superior en el mismo grupo de lenguados sin CC (Tabla 1.13, fila 1 y 9) y en la fila 3 con CC lacha. El subconjunto C, si bien fue el que numéricamente fue más veces superior (filas 6, 7, 8, 14, 15 y 16) tuvo valores altos (89,7%) pero también muy bajos (21,7%), este subconjunto fue siempre superior en el grupo de lenguados alimentados con lacha, y el valor inferior resultó de corregir con CC pejerrey el hígado (21,7%). El subconjunto E fue superior 3 veces (Tabla v, filas 4, 11 y 12) siendo siempre en el grupo de lenguados alimentados con pejerrey, teniendo dos veces valores superiores a 80% y uno en torno a 40%. Si

bien el subconjunto B fue inferior a C en cuanto a cantidad, fue dentro de este subconjunto en donde se observó mayor número de estimaciones superiores al 80%. Las comparaciones para los subconjuntos de AG entre lenguados alimentados con pejerrey y lacha y entre músculo e hígado no se pudieron realizar debido a la heterogeneidad de los valores (no fueron normales ni tuvieron homogeneidad de varianza). En promedio, los subconjuntos de AG que mostraron menos porcentaje de “aciertos” fueron el F y el G (más del 50% de las veces estimaron por debajo del 40% de la dieta real consumida).

1.3.6 Grupo pejerrey vs grupo lacha

Cuando se comparó el porcentaje de estimación dentro del músculo con piel, con el CC de la presa consumida en cada grupo entre ambos grupos (Tabla 1.13, fila 2 vs 7) se encontraron diferencias significativas ($P<0.05$), siendo superior los valores de estimación correcta para los lenguados alimentados con pejerrey. Cuando se comparó el porcentaje de estimación corrigiendo por el CC promedio en ambos grupos (Tabla 1.13, fila 4 vs 8) también resultó significativo ($P<0.05$), siendo superior en el grupo alimentado con pejerrey.

En el caso del hígado, cuando se comparó el porcentaje de estimación corrigiendo por el CC de la presa consumida en cada grupo (Tabla 1.13, fila 10 vs 15) también se encontraron diferencias significativas siendo también superiores los resultados para el grupo de lenguados alimentados con pejerrey (fila 10). En el caso de corregir el perfil de hígado con el CC promedio, la comparación entre ambos grupos (fila 12 vs 16) no mostró diferencias significativas.

En suma, el porcentaje de estimación “correcto” fue superior en el grupo alimentado con pejerrey, independientemente del subconjunto de AG utilizado o del tejido de reserva.

Dados los resultados mostrados arriba, se puede observar que con los coeficientes de calibración obtenidos de los lenguados alimentados con pejerrey se obtuvieron los mayores porcentajes de acierto, promediando en el músculo y en el hígado el $93.0\pm4.7\%$. En particular, el subconjunto de AG B, fue el que mayor porcentaje de aciertos tuvo.

1.4 Discusión

1.4.1. Identificación del sitio de reserva energética en *Paralichthys orbignyanus*

La estacionalidad en la reproducción de la mayoría de los teleósteos marinos y de prácticamente todas las especies de pleuronectiformes de las regiones templadas es un fenómeno bien conocido (Bye, 1990). *P. orbignyanus*, es un desovante parcial de verano (cuyos valores en el IGS mostraron variaciones significativas en un ciclo anual) y por ende debe movilizar sus reservas energéticas estacionalmente para aumentar su éxito reproductivo. Valiéndonos de esta estrategia, se pueden calcular diferentes índices que reflejen variaciones estacionales en las reservas a lo largo de un ciclo reproductivo, para dilucidar dónde está depositando las reservas energéticas. Identificar este lugar resulta un paso fundamental a la hora de aplicar un modelo tipo QFASA ya que será en ese sitio dónde se esté reflejando la dieta a nivel de los ácidos grasos (Iverson, 2009). Los peces pueden almacenar su energía en forma de lípidos en distintas partes de su cuerpo, como grasa perivisceral, hígado, tejido subcutáneo (entre la piel y el músculo) y músculo (Ackman, 1980). *P. orbignyanus* no presenta grasa perivisceral y no se encuentra documentado el lugar de reserva energética.

Como aproximaciones a este tema, se calculó el índice hepatosomático (HSI) y el factor de condición (K). Este último generalmente se asocia a las reservas de energía relacionadas con la alimentación, estados de madurez sexual, y condiciones ambientales (Costopoulos & Fonds, 1989). El HSI también se encuentra vinculado al almacenamiento de energía previo a la reproducción en muchos peces.

En este estudio, se observó que en octubre, mes en donde se inicia la estación reproductiva para esta especie, el K fue significativamente mayor, lo que posiblemente esté relacionado con el acúmulo de energía para la reproducción. A su vez, los menores valores de K fueron en abril, donde justamente termina la estación reproductiva. Esto evidenciaría que *P. orbignyanus* está acumulando (al menos en parte) sus reservas energéticas en la masa muscular (específicamente en el tejido subcutáneo). Robaldo (2003) trabajando con la misma especie en las costas de Casino (Brasil), encuentra que el valor de K indicó claramente un aumento durante la primavera y el otoño y una reducción durante los períodos de invierno y desove, aunque no encontró diferencias significativas entre los meses. Este autor encontró que los lenguados aumentan aproximadamente 32% el valor de K, mientras que en este

estudio el aumento en este índice fue del 19%. Por otra parte, el hecho de que los lenguados tengan más lípidos en el músculo con piel en octubre que en mayo (Tabla 1.4), refuerza la idea de que estén depositando sus reservas energéticas allí, mostrando que luego de terminada la estación de desove (mayo) estos tienen menos reservas energéticas, reflejadas en el valor promedio de K (1,11). Este valor, si bien es bajo no presenta diferencias significativas con octubre, pudiendo estar reflejando que los lenguados ya comenzaron la temporada de recuperación y engorde en las lagunas costeras. El valor promedio más bajo de K (1,00) en abril es de lenguados del mar, para los que ya terminó la estación de desove y posiblemente estén retornando a las zonas estuarinas para el engorde.

El HSI en este estudio también fue significativamente mayor en octubre (inicio de la estación reproductiva), encontrándose una variación entre mayo y octubre del 51,5%, este valor estaría indicando que *P. orbignyanus* realiza deposiciones energéticas en el hígado. Robaldo (2003) también encontró que *P. orbignyanus* aumenta el peso del hígado en los primeros estadios de desarrollo gonadal (relación directa entre IGS e IHS). En especies que hacen mayoritariamente la deposición energética en el hígado (*Gadus morhua*) se ha observado que su HSI aumenta 4,5 veces (de 2 a 9) (Yaragina & Marshal, 2000). Si bien para *P. orbignyanus* el HSI también aumentó (de 0,82 a 1,69), este aumento fue menos marcado (2 veces). El hecho de que los lípidos aumentaran en el hígado en octubre (temporada pre desove) y mostraran diferencias con mayo (temporada de descanso), estaría indicando que los lenguados acumulan lípidos antes de la temporada reproductiva en el hígado, quizás con valores no tan extremos como aquellas especies que sólo acumulan energía en el hígado.

A la luz de estos resultados, se podría afirmar que esta especie está depositando sus reservas energéticas tanto en el músculo con piel como en el hígado. Según lo mencionado anteriormente para Braekken (1959) y Sheridan (1994) sería esperable que *P. orbignyanus* depositara sus reservas en el hígado, y para otros autores (Podrazhanskaya & Yarzhombek, 1970; Shevchenko, 1971; Henderson & Tocher, 1987) se esperaría que lo hiciera en el tejido subcutáneo y en el músculo. Posiblemente, esta especie presente ambas estrategias, por lo cual ninguno de estos tejidos muestra valores extremos, como aquellas especies que sólo depositan en un tejido.

Estos resultados conllevarían que tanto el tejido subcutáneo como el hígado resultaran los sitios plausibles de reflejar la dieta consumida, algo que fue observado durante los ensayos de alimentación controlada.

1.4.2 Experiencias de alimentación controlada y coeficientes de calibración

Los lenguados utilizados en el experimento de alimentación controlada fueron individuos adultos, que se encontraban fuera de temporada reproductiva, justamente en los meses donde están generando reservas energéticas. Esto a su vez asegura que las influencias de los procesos fisiológicos asociados a la madurez sexual, al desove, la migración o la inanición sean evitados (Sargent & Henderson, 1995), a fin de generar el menor sesgo posible en cuanto al reflejo de la dieta consumida.

Luego de 20 semanas de alimentación con presas de diferente tenor lipídico y de haber aumentado algo más del 10% del peso, los lenguados de ambos grupos presentaron en el músculo dorsal con piel valores de lípidos cercanos a los iniciales en la naturaleza (Tabla 1.6) evidenciando posiblemente los valores en tenor lipídico normales para la especie. En el hígado el grupo alimentado con pejerrey tuvo valores cercanos a los iniciales, pero el grupo alimentado con lacha presentó valores superiores, algo que pudo ser provocado por la gran diferencia y/o variación en la cantidad de lípidos de la presa consumida.

Hubieron patrones similares entre los coeficientes de calibración calculados tanto para el grupo alimentado con pejerrey como con lacha (Fig. 1.9), sugiriendo que los procesos metabólicos subyacentes fueron comunes entre lenguados y dietas. Se puede observar que existe una tendencia generalizada de la mayoría de los ácidos grasos del músculo con piel del predador (semana 20) a aproximarse al valor de la presa consumida (Tablas 1.8 y 1.9, Figs. 1.5 y 1.6), lo que conlleva también que haya una tendencia de los coeficientes de calibración a acercarse a 1, aunque no llegan nunca a este valor exacto (Tabla 1.12). Cabe destacar que los lenguados alimentados con pejerrey muestran una tendencia más fuerte a acercarse a 1 que los alimentados con lacha. A pesar de esto, durante la semana 5, 12 o 20, el perfil de ácidos grasos de ambos grupos de lenguados tuvo variaciones, y no se alcanzó la estabilización en el perfil de AG en dos períodos de biopsia consecutiva, por lo que no se puede asegurar que 20 semanas sea un tiempo razonable para estabilizar el perfil de AG en *Paralichthys orbignyanus*.

Turchini *et al.*, (2009) establecen que si durante un experimento se alimenta con una dieta que tiene valores de contenido lipídico muy superior a la especie alimentada, ésto podría suprimir la síntesis *de novo* o aumentar la β-oxidación de los ácidos grasos en los tejidos de reserva. Propone entonces, que para dar cuenta del metabolismo lipídico en una especie dada, la mejor estrategia es alimentarla con una dieta de contenido lipídico similar. En este estudio ambas presas utilizadas durante el experimento de alimentación controlada tuvieron mayor contenido de lípidos, aunque destaca la lacha teniendo casi 12 veces más, a diferencia del pejerrey cercano a 4 veces más (Tabla 1.6). Cabe destacar que el pejerrey es una presa conocida para esta especie en la naturaleza (Norbis & Galli, 2004) mientras que la lacha no. El elevado tenor lipídico y la alta variación intraespecífica que tiene la lacha sugeriría que esta presa no es la adecuada para dilucidar aspectos metabólicos de *P. orbignyanus*, en particular para el cálculo de coeficientes de calibración.

1.4.3 Subconjuntos de AG durante la validación del modelo tipo QFASA utilizado

La precisión de la estimación de la dieta está muy influenciada por el subconjunto de AG seleccionado para correr un modelo QFASA, por ende se debe prestar especial atención a este respecto (Budge *et al.*, 2006). La construcción de los siete subconjuntos de AG en este trabajo (Tabla 1.1) incluyeron tanto ácidos grasos dietarios como no dietarios (Dalsgaard *et al.*, 2003). Los ácidos grasos dietarios o esenciales son aquellos que reflejan mejor la dieta consumida ya que no son sintetizados *de novo* por vertebrados y en general pertenecen a las series n-3 y n-6. En particular, en los peces marinos el ácido docosahexaenoico (22:6n3, DHA), el ácido eicosapentaenoico (20:5n3, EPA) (Cowey, 1988) y el ácido araquidónico (20:4n6, ARA) (Bessonart, 1997) constituyen ácidos grasos esenciales. Estos peces no tienen la capacidad de elongar y/o desaturar a partir de sus precursores de cadena corta (ácido linolénico 18:3n3 y ácido linoleico 18:2n6), algo que sí hacen los peces de agua dulce (Sargent *et al.*, 2002).

Durante el proceso de selección de AG candidatos a correr en el modelo QFASA, la opción primaria es incluir sólo los AG dietarios, a pesar de que los ácidos grasos no dietarios constituyen un alto porcentaje del total del perfil de AG de la mayoría de las especies. Es por esto, que el modelo QFASA toma en cuenta la cantidad relativa de cada AG y minimiza una función como la Kulback-Liebler la cual pondera los ácidos grasos minoritarios o raros. Budge *et al.*, (2012) al trabajar con experiencias

controladas de alimentación con *Salmo salar* observó que el subconjunto de AG que mejor reflejaba la dieta fue aquel que además de contener AG dietarios incluía AG no dietarios, en particular los llamados “bultosos” pues luego de su inclusión el porcentaje del total de AG se incrementó de aproximadamente 39% al 90% (16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:0, etc.). Por esta razón, estos autores proponen que una buena estrategia para diseñar los subconjuntos de AG es incorporar -además de los dietarios- y en función de su concentración aquellos AG que significativamente aumenten el porcentaje en el subconjunto. Por esta razón, en este estudio los 7 subconjuntos de AG ensayados abarcaban todas las posibilidades. Estos contenían de 10 a 36 AG e iban desde $12,6 \pm 4.3\%$ al $97,8 \pm 1.3\%$ del total de AG (Tabla 1.1). Nuestros resultados mostraron -a diferencia de lo encontrado por Budge *et al.*, (2012)- que el subconjunto que mejor reflejó la dieta sólo representaba un $34.0 \pm 10.6\%$ del total de AG e incluía mayoritariamente AG de las series n-3 y n-6 (casi exclusivamente AG dietarios).

Al comparar el desempeño del subconjunto B con el A (que incluyó casi todos los AG y representó el $97.8 \pm 1.3\%$ del total de AG) se observó que el B tuvo mejores “aciertos” a la hora de estimar la dieta real consumida por cada grupo de lenguados (independientemente del tejido de reserva utilizado). Esto concordaba con las expectativas de que el B reflejara mejor la dieta al excluir todos los AG no dietarios del subconjunto A para crear el B (Tabla 1.1). Debido a que los AG esenciales o dietarios pueden estar involucrados en procesos de retención selectiva (Henderson & Tocher, 1987) justamente por su característica de esenciales, se crearon diferentes subconjuntos (C-G) excluyendo diferentes subgrupos de éstos para comparar si algún subconjunto llegaba a mejores resultados en el reflejo de la dieta real consumida. Sin embargo, ningún subconjunto de los propuestos llegó a superar al B en cuanto al porcentaje de aciertos, indicando así que la característica de esencialidad de los AG incluidos no afectó la incorporación en los tejidos de reserva. Esto también puede ser debido a que los experimentos de alimentación controlada tuvieron lugar fuera de la época de puesta. Algo a destacar es que el subconjunto de AG F, es estrictamente más dietario que el B, pues el B además incluye el 16:2, el 18:4n1, el 20:1 y el 22:1, aún así fue el B el que mostró mejores resultados, indicando que además de los dietarios estos 4 ácidos grasos “mejorarían” la performance del modelo.

1.4.4 Dietas y lugar de reservorio de energía durante la validación del modelo QFASA

Los resultados obtenidos durante la verificación de si el modelo estimaba lo que realmente habían consumido (validación del modelo) fueron en general peores en el grupo de lenguados alimentados con lacha. Tomando en cuenta todos los subconjuntos de AG propuestos -y aplicando el CC de pejerrey para el grupo pejerrey y el de lacha para el grupo lacha-, el grupo de lenguados alimentados con pejerrey promedia el $93,0 \pm 4,7\%$ en el músculo con piel y el $93,2 \pm 4,7\%$ en el hígado. En cambio el grupo de lenguados alimentado con lacha promedia el $71,2 \pm 12,6\%$ en el músculo con piel y el $76,8 \pm 6,0\%$ en el hígado. Esto podría estar relacionado con la alta variabilidad tanto en el tenor lipíco como en los perfiles de AG observados en la lacha. Si se observan sólo los resultados tomando en cuenta el subconjunto de AG B, cuando se corrió el modelo aplicando los CC de lacha, para estimar el consumo de lacha, el modelo identifica correctamente el $80,5 \pm 4,6\%$ en el músculo con piel y un $70,4 \pm 16,9\%$ en el hígado, mientras que sin CC en el músculo con piel no logra ningún resultado y en el hígado sólo llega al $10,0 \pm 2,1\%$. A diferencia del grupo pejerrey que estima un $98,7 \pm 2,5\%$ y $77,3 \pm 12,3\%$ en el músculo con piel con y sin CC respectivamente y un $99,0 \pm 2,2\%$ y $88,2 \pm 14,0\%$ en el hígado, con y sin CC respectivamente. Estos datos estarían evidenciando nuevamente que la lacha no es una especie adecuada para este tipo de experimento, al menos con *P. orbignyanus*.

Considerando los sitios de reserva que se tomaron en cuenta para esta especie en este estudio se observa que tanto el músculo con piel y el hígado generaron buenas estimaciones de la dieta real consumida durante el proceso de validación (98,7 y 77,3% y 99,0 y 88,2% en hígado, con y sin CC respectivamente). Sin embargo, el hígado en general es un órgano complejo y difícil de interpretar, y muchas veces puede estar reflejando el metabolismo a corto plazo, en lugar de la dieta asimilada a largo plazo (Bruslé & González, 1996). Por esta razón, y observando las pequeñas diferencias que muestran estos dos sitios en el reflejo de la dieta consumida (Tabla 1.11), será preferible trabajar tomando en cuenta el músculo con piel para las subsecuentes estimaciones de la dieta de *P. orbignyanus* en la naturaleza.

En resumen y dados los resultados obtenidos hasta aquí se puede observar que: a) el modelo adaptado para *P. orbignyanus* funciona “bien” estimando qué comen los lenguados durante los experimentos de alimentación controlada (validación); b) el músculo con piel funciona como un reservorio de energía en esta especie y refleja la

dieta consumida; c) el subconjunto de ácidos grasos B es el que más refleja la dieta consumida; d) la aplicación de los coeficientes de calibración obtenidos de alimentar lenguados con pejerrey fueron superiores. Luego de que el modelo se validara experimentalmente, sumado al hecho de que existen aportes acerca de la dieta de esta especie en la Laguna de Rocha por contenidos estomacales (Norbis & Galli, 2004) serán las condiciones b, c y d las que se utilizarán en la subsecuente aplicación del modelo QFASA en la naturaleza (Capítulo 2).

Capítulo 2

Estimación de la dieta de *Paralichthys orbignyanus* en la naturaleza (Laguna de Rocha)

2.1 Introducción

El análisis de muchos ecosistemas en el mundo sugiere que entre los lenguados se distinguen dos grupos según el tipo de presa que consumen: los que comen poliquetos y pequeños crustáceos bentónicos y los piscívoros que consumen peces enteros y calamares (Link *et al.*, 2005). Los primeros consumen mayormente poliquetos y anfípodos abarcando normalmente entre un 40 a 70% de su dieta, llegando en algunos casos extremos a consumir casi exclusivamente poliquetos (más del 90%) (Pearcy & Hancock, 1978). Es por esto que los lenguados son una vía energética importante en la conversión de la producción bentónica hacia niveles superiores en la trama trófica. Los lenguados piscívoros, presentan bocas más grandes y anchas y consumen grandes cantidades de otros peces. Este grupo en general presenta tallas más grandes, llegando a medir más de 2 metros, como el halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). La mayoría de los peces consumidos por estos lenguados son especies de peces forrajeras y los calamares son otra presa muy común dentro de los piscívoros. Los peces constituyen de un 40 a un 80%, llegando incluso en algunos a representar más del 90% de la dieta (Tokranov & Maksimenkov, 1994) siendo en general las especies más grandes. La Figura 2.1 muestra la contribución de peces, invertebrados y restos de peces en 4 especies de lenguados piscívoros grandes (*Hippoglossus stenolepis*, *Hippoglossus hippoglossus*, *Platichthys stellatus*, *Atheresthes stomias*), evidenciando que en algunos piscívoros los invertebrados pueden representar porcentajes altos en la dieta.

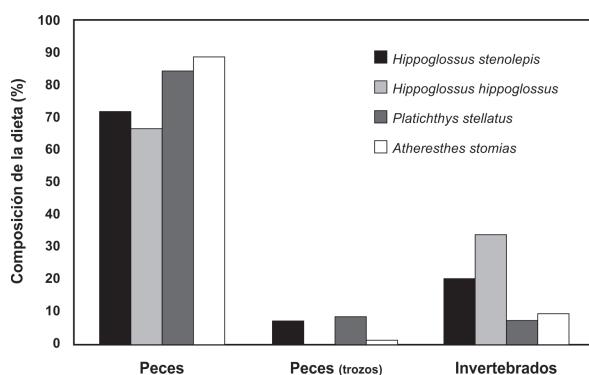


Figura 2.1. Composición general de la dieta de 4 especies de peces planos piscívoros.

Si bien todos los lenguados consumen pequeños poliquetos y crustáceos en estadios juveniles (Link *et al.*, 2005) la mayoría de ellos hacen un cambio ontogenético clásico al crecer (Werner & Gilliam 1984) cambiando el tipo de alimentación. De forma general se puede afirmar que dentro de las limitaciones impuestas por su morfología, los lenguados se alimentan de manera oportunista, engullendo la presa más fácil y más abundante en un lugar y tiempo determinado (Link *et al.*, 2005), por lo que podrían a su vez constituir muestreadores naturales de los ecosistemas.

Los hábitos alimenticios de *P. orbignyanus* han sido evaluados a través de contenido estomacal en Argentina en el estuario de Bahía Blanca (Lopez-Cazorla & Forte, 2005) y en la Laguna de Mar Chiquita (Rivera-Prisco *et al.*, 2001) y en Uruguay en la Laguna de Rocha (Norbis & Galli, 2004) y en el Arroyo Pando (Carnikian, 2006).

Rivera-Prisco *et al.*, (2001) trabajó con individuos juveniles encontrando que consumen principalmente poliquetos y crustáceos. Lopez-Cazorla & Forte (2005) trabajando con mayor amplitud de tallas (7 a 87,5 cm) encontraron diferencias en la dieta entre estaciones y tallas. Estos autores proponen que en términos generales *P. orbignyanus* presenta una dieta piscívora-carcinófaga, que en estadios tempranos tienen una dominancia de crustáceos en su dieta, mientras que en tallas mayores hay predominancia de peces. También encuentran que durante el verano y el otoño las presas mayormente consumidas son peces, mientras que en primavera dominan los crustáceos (misidiáceos, camarones y langostinos) en lenguados menores a 45 cm, siendo los peces la presa preponderante en tallas superiores.

Norbis & Galli (2004) en la Laguna de Rocha y trabajando con tallas de 25 a 64 cm, encontraron que *Odonthestes argentinensis* -pejerrey- fue el ítem mayoritario en la dieta de este lenguado, sólo encontrando algunos individuos de *Micropogonias furnieri* -corvina blanca-, *Brevoortia aurea* -lacha-, *P. orbignyanus* (canibalismo) y otros peces telósteos no identificados en la dieta de este lenguado. Proponen que la poca variación en la dieta no estuvo relacionada con la disponibilidad de presas en la laguna, pues *B. aurea* y *M. furnieri* son recursos abundantes de este cuerpo de agua y los adultos de *P. orbignyanus* tienen una dieta especializada y selectiva. Carnikian (2006) trabajando en la zona estuarial del arroyo Pando observó que los lenguados pasan de un hábito carcinófago a piscívoro a partir de los 23 cm, consumiendo crustáceos, peces y moluscos, destacando *Neomysis americana* -misidiáceos- (aprox.

50%) y *Micropogonias furnieri* (aprox. 36%), El verano fue la estación más diversa en cuanto a ítems alimenticios.

Las lagunas costeras son ecosistemas complejos que se encuentran dentro de los más productivos de la tierra (Harrison & Parsons, 2000). La Laguna de Rocha es una laguna somera y salobre de poca profundidad que se conecta periódicamente con el mar lo que produce un régimen hidrológico con un fuerte gradiente de salinidad, dominado en el sur por aguas marinas y al norte por agua dulce (Conde *et al.*, 2000; Aubritot *et al.*, 2005). Rodríguez-Graña *et al.*, (2008) analizó estacionalmente si estas variaciones ambientales inducían cambios en la estructura de la trama trófica, encontrando que a pesar de la variabilidad ambiental entre el norte y el sur la estructura de la red trófica fue similar en ambos lados. Ese trabajo involucró la relación de isótopos estables de carbono y nitrógeno para establecer la estructura de la trama trófica, situando a *P. orbignyanus* como uno de los predadores tope del ecosistema pudiéndose obtener un listado de presas potenciales para este lenguado en la Laguna de Rocha.

Debido a que este ecosistema podría considerarse semicerrado, que *P. orbignyanus* constituye un predador tope dentro del mismo en donde se conocen casi todas sus presas potenciales y sumado al hecho que este lenguado se adentra en este sitio para alimentarse fuera de la temporada de desove, hacen de esta especie y de este lugar un escenario ideal para poder adaptar un modelo que involucre lípidos y ácidos grasos para poder inferir la dieta de este lenguado, más específicamente mediante el análisis cuantitativo del perfil de ácidos grasos (QFASA) explicado en el capítulo anterior.

Para poder estimar la dieta de *Paralichthys orbignyanus* en la Laguna de Rocha mediante el análisis cuantitativo del perfil de ácidos grasos se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Identificar y caracterizar desde el punto de vista bioquímico (contenido de lípidos y perfil de ácidos grasos) todos presas potenciales de *Paralichthys orbignyanus* en la Laguna de Rocha

- ✓ Identificar y caracterizar desde el punto de vista bioquímico (contenido de lípidos y perfil de ácidos grasos) el tejido de reserva de *Paralichthys orbignyanus* en la Laguna de Rocha fuera de la temporada de desove
- ✓ Adaptar matemáticamente el modelo QFASA originariamente propuesto para mamíferos marinos a peces, específicamente para *Paralichthys orbignyanus*
- ✓ Obtener una estimación cuantitativa de la dieta de *Paralichthys orbignyanus* en la Laguna de Rocha fuera de la temporada de puesta o durante la temporada de engorde mediante la aplicación del QFASA incorporando los coeficientes de calibración previamente obtenidos

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Área de estudio

La Laguna de Rocha (Fig. 2.2) es una laguna micromareal, somera y salobre de 72 km², tiene una profundidad media de 0,6 m y se conecta periódicamente con el mar lo que le genera un fuerte gradiente de salinidad de norte a sur. Se encuentra ubicada sobre la costa del océano Atlántico (34° 38' S, 54°17'W) (Sommaruga & Conde, 1990).

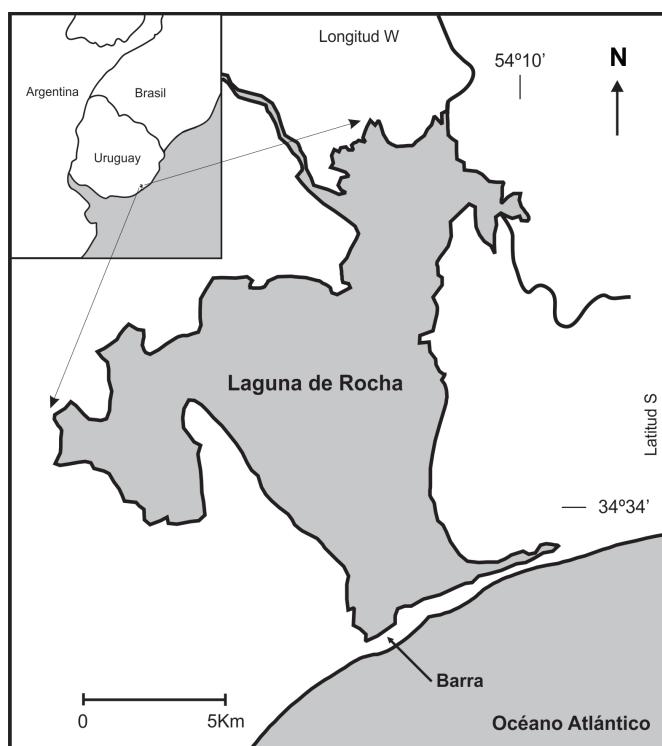


Figura 2.2. Laguna de Rocha, Área de estudio para la determinación de la dieta de *Paralichthys orbignyanus* mediante el análisis cuantitativo del perfil de ácidos grasos (QFASA).

2.2.2. Muestreo de lenguados adultos y presas potenciales en la Laguna de Rocha

Los muestreos de lenguados adultos y presas potenciales en la Laguna de Rocha tuvieron lugar de abril a octubre, desde el 2008 al 2010 (evitando la estación de desove). En total se realizaron 16 muestreos.

Colecta de lenguados: La colecta de tejido de los lenguados adultos se realizó con los pescadores artesanales que pescan en el lugar, ellos usan redes de calada de 11 cm entre nudos que calan al atardecer y levantan al amanecer. Se coordinó con ellos para que durante el proceso de eviscerado y preparado de filetes para su comercialización pudiéramos realizar la colecta de tejido. Se realizaron 8 muestreos de lenguados

adultos. Los peces fueron medidos, pesados, sexados y se colectó el hígado, las gónadas y un trozo de músculo dorsal con piel, que fueron congelados a -20°C hasta su análisis.

Colecta de presas potenciales: Basados en la información de las presas reales y potenciales de *P. orbignyanus* (Rivera Prisco *et al.*, 2001; Norbis & Galli, 2004; López-Cazorla & Forte 2005; Carnikián, 2006; Rodríguez-Graña *et al.*, 2008) se realizaron varios muestreos exhaustivos para poder colectar todas las presas potenciales de *P. orbignyanus* en la Laguna de Rocha. Se utilizaron redes de arrastre de varios tamaños de malla (2, 6 y, 11 cm entre nudo). Se realizaron arrastres embarcados a motor y arrastres manuales (en las zonas más someras). Se realizaron además arrastres manuales con una red de mosquitero (1mm) en la orilla para capturar presas. Se utilizaron corers, dragas y colectas manuales. Se eligieron 4 puntos de muestreo (2 al norte y 2 al sur). Las muestras bióticas obtenidas se identificaron hasta el menor nivel taxonómico posible. Las presas (a excepción de *Heteromastus similis*) fueron contadas, medidas y pesadas (0,1 cm y 0,0001g) y se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su posterior análisis. Debido a que *P. orbignyanus* presenta canibalismo, los ejemplares juveniles capturados fueron incluidos dentro de las presas potenciales.

2.2.3 Análisis bioquímico y cromatografía de gases de lenguados y presas de la Laguna de Rocha

El contenido de lípidos y la determinación de ácidos grasos tanto de los lenguados como de las presas potenciales fue realizado según los procedimientos explicitados en la sección 1.2.7 de materiales y métodos en el Capítulo 1. Las muestras fueron previamente liofilizadas para su mejor homogeneización. Las presas potenciales fueron analizadas enteras, tal cual como *P. orbignyanus* las engulle en la naturaleza, por tener una estrategia de alimentación “sit and wait”.

2.2.4 Estadística y modelo matemático QFASA

Se hizo un agrupamiento jerárquico (Hierarchical clustering analysis, Matlab 7.0) tomando en cuenta 36 AG (Tabla 1.1, Subconjunto A) y utilizando la distancia de Kullback-Leibler con el promedio del perfil de ácidos grasos de todas las presas potenciales colectadas en la Laguna de Rocha. Este tipo de análisis exploratorio es un paso previo a correr el modelo QFASA (Iverson *et al.*, 2004) pues sirve para agrupar

aquellas presas que tuvieran un perfil de AG muy parecido entre sí, ya que si se agregan en la matriz de base de datos 2 presas distintas con un perfil demasiado parecido, estos podría conducir a resultados erróneos o directamente confundir al programa a tal punto que no encuentre mínimos (no itere).

El modelo QFASA desarrollado y adaptado en Matlab 7.0 para este estudio, fue programado y corrido según lo explicado en la sección 1.2.10 de materiales y métodos del Capítulo 1. Se tomó el promedio del músculo dorsal con piel de los lenguados adultos capturados fuera de la época de desove en la Laguna de Rocha como predador, y se corrió el modelo contra todos los perfiles de AG de las presas colectadas para captar la variabilidad de las presas.

Iverson *et al.*, (2004) plantea que este tipo de modelos tienen la suficiente robustez para ser empleados sin coeficientes de calibración y que el empleo de los mismos mejora y afina la estimación. Debido a esto, se realizaron corridas con y sin coeficientes de calibración. En caso de corregir el tejido de reserva del predador, se utilizó el coeficiente de calibración obtenido con el grupo de lenguados alimentados con pejerrey en la semana 20. Aunque se estableció que el subconjunto B de AG (Tabla 1.1) fue el que mejor reflejaba la dieta, en esta etapa se corrió también el modelo con y sin coeficientes de calibración tomando en cuenta los subconjuntos de AG: A, B, C y D (Tabla 1.1) para observar y comparar resultados en la naturaleza.

2.3 Resultados

2.3.1 Lípidos y ácidos grasos en presas potenciales y predadores

Se colectó muestra de tejido de 33 lenguados adultos (23 hembras y 10 machos). Los individuos midieron: $44,0 \pm 8,1$ cm y pesaron: $1,2 \pm 0,5$ kg.

Se colectaron y analizaron 1932 individuos de 17 presas potenciales para *Paralichthys orbignyanus* en la Laguna de Rocha. La Tabla 1.1 detalla todas las presas potenciales colectadas, así como también la longitud total (LT) y el peso de las presas. También se muestra el número de individuos que fue tenido en cuenta con propósitos bioquímicos, pues cuando el número de individuos y de muestras analizadas no coincide (como es el caso de individuos pequeños) éstos fueron agrupados y analizados en conjunto. Cinco de las presas potenciales fueron peces y las demás invertebrados. A excepción de isópodos, anfípodos y *Oligosarcus s.p.* se pudo determinar la especie. *Heteromastus similis* fue la única presa en la que no se determinó ni el peso ni la longitud total. Las especies de peces colectadas abarcan las citadas como presas en contenido estomacal en la Laguna de Rocha (Norbis & Galli, 2004).

Tabla 2.1. Cantidad de individuos y de muestras analizadas para realizar la base de datos de ácidos grasos de las presas potenciales para *Paralichthys orbignyanus* en la Laguna de Rocha, x= promedio, de= desvío estándar, Mín: mínimo, Max: máximo.

| Items | Número de individuos | Núm de muestras analizadas* | LT (x±de) ó Mín - Max (cm) | Peso (x±de) ó Mín - Max (grs) |
|----------------------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Peces | | | | |
| <i>Odontesthes argentinensis</i> | 13 | 13 | 15,05 ± 2,47 | 24,63 ± 10,49 |
| <i>Micropogonias furnieri</i> | 12 | 6 | 3,90 - 19,30 | 0,60 - 64,00 |
| <i>Brevoortia aurea</i> | 14 | 14 | 5,10 - 20,40 | 10,50 - 20,40 |
| <i>Jenynsia multidentata</i> | 36 | 7 | 3,01 ± 0,42 | 0,30 ± 0,13 |
| <i>Oligosarcus sp.</i> | 3 | 3 | 6,50 ± 0,50 | 5,50 ± 0,70 |
| Invertebrados | | | | |
| <i>Callinectes sapidus</i> | 24 | 6 | 1,74 ± 0,43 | 0,43 ± 0,31 |
| <i>Chasmagnathus granulatus</i> | 51 | 17 | 2,51 ± 0,21 | 9,24 ± 1,97 |
| <i>Cryptopagrus angulatus</i> | 48 | 18 | 1,99 ± 0,57 | 3,87 ± 2,47 |
| <i>Palaemonetes argentinus</i> | 18 | 12 | 2,17 ± 0,85 | 2,15 ± 0,99 |
| <i>Penaeus paulensis</i> | 25 | 5 | 10,80 - 18,00 | 7,30 - 31,00 |
| <i>Neomysis americana</i> | 400 | 7 | 1,35 ± 0,16 | 0,01 ± 0,00 |
| <i>Laeonereis acuta</i> | 258 | 5 | 3,29 ± 0,81 | 0,00 ± 0,00 |
| <i>Heteromastus similis</i> | 31 | 3 | - - | - - |
| Amphipoda | 585 | 8 | 0,60 ± 0,20 | 0,01 ± 0,00 |
| Isopoda | 63 | 7 | 0,99 ± 0,34 | 0,02 ± 0,01 |
| <i>Heleobia australis</i> | 263 | 8 | 5,90 ± 1,26 | 0,02 ± 0,01 |
| <i>Erodona mactroides</i> | 88 | 11 | 12,00 ± 3,70 | 0,50 ± 0,25 |

* Cuando el número de individuos no coincide con el número de análisis, significa que las muestras fueron homogeneizadas en conjuntos con fines analíticos.

La Tabla 2.2 muestra el promedio del contenido de lípidos y el promedio de algunos AG seleccionados de *P. orbignyanus* adultos y sus presas potenciales colectados en la Laguna de Rocha durante todo el período de estudio. Los AG saturados, monoinsaturados y poliinsaturados así como los altamente insaturados de la serie n-3 y los totales para las series n3, n6 y n9 también se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Porcentaje de lípidos y principales ácidos grasos (expresados en % de área) de músculo dorsal con piel de *Paralichthys orbignyanus* y de sus presas potenciales en la Laguna de Rocha. Los valores están expresados como el promedio±desvío estándar, PS: Peso seco, PH: Peso húmedo, AG: Ácidos grasos.

| | <i>Paralichthys orbignyanus</i> adultos | <i>Odontesthes bonaerensis</i> | <i>Micropogonias furnieri</i> | <i>Brevoortia aurea</i> | <i>Jenynsia multidentata</i> | <i>Oligosarcus</i> sp. | <i>Callinectes sapidus</i> | <i>Chasmagnathus granulatus</i> | <i>Cryptopagrus angulatus</i> |
|--------------------------------|---|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| % Lípidos PS | 4,1 ± 1,5 | 7,2 ± 1,7 | 8,6 ± 5,1 | 9,8 ± 2,4 | 7,2 ± 1,4 | 10,7 ± 9,9 | 3,9 ± 1,6 | 2,7 ± 1,2 | 3,3 ± 0,8 |
| % Lípidos PH | 0,8 ± 0,3 | 1,8 ± 0,3 | 1,8 ± 1,1 | 2,1 ± 1,2 | 1,7 ± 0,4 | 2,6 ± 0,8 | 0,9 ± 0,5 | 0,6 ± 0,3 | 0,8 ± 0,3 |
| % Área AG | | | | | | | | | |
| 14:0 | 2,3 ± 0,9 | 3,5 ± 1,7 | 1,7 ± 0,8 | 8,6 ± 1,9 | 3,0 ± 0,9 | 2,7 ± 0,2 | 1,8 ± 1,0 | 1,8 ± 0,6 | 1,8 ± 0,3 |
| 16:0 | 22,7 ± 4,1 | 23,5 ± 3,2 | 21,4 ± 2,8 | 26,1 ± 5,5 | 27,1 ± 3,5 | 29,4 ± 1,6 | 15,0 ± 2,2 | 17,1 ± 3,3 | 19,1 ± 1,8 |
| 16:2 | 1,0 ± 0,2 | 0,6 ± 0,2 | 1,0 ± 0,4 | 1,7 ± 0,4 | 0,6 ± 0,3 | 0,7 ± 0,3 | 1,1 ± 0,6 | 0,4 ± 0,4 | 0,2 ± 0,1 |
| 18:0 | 7,4 ± 1,3 | 6,2 ± 2,1 | 11,3 ± 2,2 | 6,2 ± 2,3 | 11,6 ± 1,7 | 5,8 ± 0,7 | 7,7 ± 1,1 | 6,7 ± 1,4 | 6,5 ± 1,0 |
| 18:1n-9 | 13,2 ± 3,1 | 16,0 ± 4,8 | 11,5 ± 0,5 | 14,0 ± 3,4 | 13,2 ± 2,3 | 5,7 ± 1,1 | 6,1 ± 0,7 | 11,2 ± 2,0 | 9,6 ± 2,9 |
| 18:2n-6 | 1,6 ± 0,6 | 1,2 ± 0,7 | 1,2 ± 0,3 | 1,3 ± 0,3 | 3,7 ± 1,4 | 0,8 ± 0,4 | 3,6 ± 2,9 | 5,1 ± 1,4 | 2,6 ± 1,0 |
| 18:3n-3 | 0,9 ± 0,4 | 1,1 ± 0,1 | 0,7 ± 0,6 | 1,0 ± 0,7 | 1,0 ± 0,3 | 1,1 ± 0,0 | 1,7 ± 0,7 | 3,2 ± 1,8 | 2,1 ± 0,7 |
| 20:1 | 1,1 ± 0,7 | 1,6 ± 0,6 | 2,7 ± 2,5 | 3,4 ± 0,7 | 1,5 ± 0,3 | 1,3 ± 1,2 | 3,2 ± 1,9 | 1,6 ± 0,4 | 2,7 ± 1,0 |
| 20:2n-6 | 0,2 ± 0,1 | 0,2 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 | 0,6 ± 0,2 | 0,3 ± 0,1 | 0,2 ± 0,2 | 1,2 ± 0,4 | 0,8 ± 0,2 | 0,9 ± 0,2 |
| 20:4n-6 | 3,9 ± 1,4 | 2,6 ± 1,2 | 3,2 ± 1,4 | 0,7 ± 0,3 | 3,1 ± 0,9 | 2,2 ± 0,6 | 4,8 ± 2,3 | 6,1 ± 2,3 | 5,6 ± 0,9 |
| 20:5n-3 | 3,5 ± 1,3 | 4,9 ± 2,0 | 4,8 ± 1,3 | 4,1 ± 2,7 | 0,9 ± 0,4 | 6,4 ± 1,5 | 17,1 ± 2,1 | 11,8 ± 4,1 | 13,3 ± 3,1 |
| 22:1 | 0,4 ± 0,2 | 0,6 ± 0,4 | 1,0 ± 0,3 | 0,7 ± 0,1 | 0,7 ± 0,2 | 0,4 ± 0,1 | 1,0 ± 1,0 | 0,6 ± 0,4 | 0,8 ± 0,3 |
| 22:5n-3 | 3,2 ± 1,1 | 3,4 ± 1,4 | 2,4 ± 0,6 | 1,1 ± 0,6 | 1,5 ± 0,6 | 2,0 ± 0,0 | 2,3 ± 0,5 | 0,7 ± 0,3 | 1,1 ± 0,3 |
| 22:6n-3 | 17,4 ± 7,3 | 13,1 ± 3,5 | 12,9 ± 8,8 | 5,9 ± 3,3 | 3,9 ± 1,7 | 22,0 ± 5,7 | 7,4 ± 4,1 | 5,0 ± 2,4 | 5,3 ± 1,1 |
| AG Saturados | 38,1 ± 7,7 | 36,6 ± 7,7 | 37,4 ± 4,6 | 45,0 ± 8,0 | 50,0 ± 7,6 | 34,9 ± 6,7 | 27,0 ± 2,8 | 30,4 ± 4,0 | 31,5 ± 2,7 |
| AG Monoinsaturados | 25,5 ± 6,5 | 30,9 ± 4,1 | 26,9 ± 7,8 | 31,7 ± 4,4 | 31,1 ± 2,2 | 20,5 ± 7,8 | 24,1 ± 5,7 | 28,4 ± 5,8 | 29,3 ± 3,8 |
| AG Poliinsaturados | 35,6 ± 9,8 | 32,5 ± 6,9 | 29,5 ± 4,0 | 23,3 ± 8,9 | 18,9 ± 6,8 | 44,6 ± 1,1 | 32,4 ± 9,8 | 41,2 ± 9,1 | 39,2 ± 5,4 |
| n-9 | 15,4 ± 3,4 | 18,2 ± 4,9 | 14,7 ± 3,2 | 18,0 ± 3,9 | 16,0 ± 2,6 | 9,1 ± 2,0 | 8,5 ± 3,5 | 13,6 ± 2,4 | 12,8 ± 3,4 |
| n-6 | 7,4 ± 1,8 | 5,3 ± 1,6 | 6,7 ± 1,8 | 3,9 ± 0,7 | 7,9 ± 2,6 | 4,3 ± 0,0 | 11,6 ± 4,8 | 13,2 ± 2,4 | 10,3 ± 1,8 |
| n-3 | 26,9 ± 8,7 | 24,3 ± 5,3 | 22,5 ± 8,6 | 14,9 ± 7,7 | 9,0 ± 3,1 | 35,1 ± 3,9 | 30,9 ± 4,7 | 24,2 ± 7,1 | 25,3 ± 4,4 |
| n-3 HUFA | 25,0 ± 8,7 | 22,0 ± 5,5 | 20,6 ± 9,6 | 12,1 ± 6,8 | 6,8 ± 2,7 | 32,5 ± 4,8 | 27,6 ± 5,3 | 18,2 ± 6,6 | 20,5 ± 3,7 |
| <i>Palaemonetes argentinus</i> | | <i>Penaeus paulensis</i> | <i>Neomysis americana</i> | <i>Laeonereis acuta</i> | <i>Heteromastus similis</i> | Amphipoda | Isopoda | <i>Heleobia australis</i> | <i>Erodona mactroides</i> |
| % Lípidos PS | 5,4 ± 0,6 | 7,1 ± 2,2 | 9,2 ± 0,4 | 6,9 ± 1,8 | - | 3,8 ± 0,9 | - | 0,9 ± 0,5 | 0,7 ± 0,0 |
| % Lípidos PH | 0,9 ± 0,1 | 2,1 ± 0,2 | 0,7 ± 0,0 | 0,9 ± 0,1 | 1,4 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 | 2,5 ± 0,5 | 0,5 ± 0,3 | 0,40 ± 0,0 |
| % Área AG | | | | | | | | | |
| 14:0 | 1,6 ± 0,3 | 1,8 ± 0,5 | 1,8 ± 0,2 | 5,0 ± 1,5 | 5,3 ± 0,4 | 2,3 ± 0,0 | 4,0 ± 0,2 | 4,7 ± 1,2 | 2,7 ± 0,4 |
| 16:0 | 14,0 ± 0,8 | 15,7 ± 3,3 | 23,1 ± 0,8 | 24,8 ± 2,1 | 13,4 ± 1,3 | 18,8 ± 1,4 | 20,2 ± 2,0 | 25,9 ± 4,4 | 22,6 ± 4,2 |
| 16:2 | 0,4 ± 0,3 | 0,5 ± 0,1 | 0,3 ± 0,0 | 1,0 ± 0,2 | 0,8 ± 0,5 | 0,4 ± 0,1 | 1,7 ± 0,3 | 2,0 ± 0,8 | 1,3 ± 0,7 |
| 18:0 | 7,2 ± 0,3 | 7,9 ± 1,8 | 4,3 ± 0,3 | 8,0 ± 0,8 | 3,6 ± 1,2 | 4,7 ± 1,5 | 3,4 ± 1,1 | 15,8 ± 2,7 | 5,4 ± 1,5 |
| 18:1n-9 | 12,5 ± 0,8 | 7,8 ± 1,1 | 7,7 ± 0,5 | 4,0 ± 0,4 | 3,0 ± 0,3 | 11,8 ± 0,3 | 8,5 ± 0,5 | 2,3 ± 0,9 | 2,9 ± 1,0 |
| 18:2n-6 | 3,4 ± 1,3 | 3,0 ± 1,5 | 1,6 ± 0,0 | 0,7 ± 0,0 | 2,3 ± 0,3 | 3,6 ± 1,9 | 1,6 ± 0,2 | 1,8 ± 1,2 | 0,9 ± 0,1 |
| 18:3n-3 | 1,8 ± 0,2 | 1,3 ± 0,6 | 1,2 ± 0,0 | 0,7 ± 0,0 | 1,7 ± 0,5 | 3,5 ± 1,3 | 1,1 ± 0,2 | 1,8 ± 0,6 | 2,3 ± 0,4 |
| 20:1 | 1,6 ± 0,3 | 4,0 ± 1,0 | 1,5 ± 0,1 | 5,0 ± 0,7 | 4,9 ± 0,0 | 2,5 ± 0,3 | 1,2 ± 0,0 | 4,9 ± 1,6 | 4,7 ± 1,5 |
| 20:2n-6 | 0,7 ± 0,2 | 1,0 ± 0,2 | 0,0 ± 0,0 | 0,5 ± 0,1 | 1,2 ± 0,0 | 0,7 ± 0,1 | 0,2 ± 0,1 | 0,4 ± 0,2 | 0,9 ± 0,0 |
| 20:4n-6 | 5,3 ± 1,2 | 5,0 ± 0,4 | 2,4 ± 0,0 | 1,1 ± 0,3 | 3,6 ± 0,3 | 4,8 ± 1,7 | 3,1 ± 0,2 | 2,7 ± 1,8 | 2,2 ± 0,1 |
| 20:5n-3 | 17,1 ± 0,4 | 14,2 ± 3,4 | 16,5 ± 1,3 | 5,7 ± 2,1 | 8,5 ± 0,2 | 12,8 ± 0,5 | 14,2 ± 1,1 | 2,5 ± 2,0 | 7,2 ± 3,7 |
| 22:1 | 0,4 ± 0,0 | 0,7 ± 0,3 | 0,5 ± 0,0 | 1,5 ± 0,6 | 1,1 ± 0,3 | 0,9 ± 0,2 | 0,8 ± 0,5 | 4,0 ± 1,8 | 1,1 ± 0,3 |
| 22:5n-3 | 1,0 ± 0,1 | 3,4 ± 0,8 | 0,9 ± 0,1 | 1,8 ± 0,6 | 3,2 ± 0,4 | 1,2 ± 0,7 | 0,5 ± 0,0 | 0,5 ± 0,4 | 2,0 ± 0,8 |
| 22:6n-3 | 7,8 ± 0,4 | 5,6 ± 1,4 | 21,1 ± 2,0 | 0,9 ± 0,5 | 1,6 ± 0,2 | 4,2 ± 2,0 | 1,9 ± 0,1 | 2,7 ± 1,5 | 7,0 ± 3,3 |
| AG Saturados | 25,9 ± 0,5 | 29,4 ± 2,3 | 32,8 ± 1,3 | 44,6 ± 3,0 | 27,2 ± 7,3 | 29,7 ± 1,1 | 29,5 ± 3,0 | 52,3 ± 5,9 | 35,2 ± 8,4 |
| AG Monoinsaturados | 29,2 ± 1,0 | 27,2 ± 2,9 | 16,1 ± 1,1 | 33,5 ± 1,4 | 32,4 ± 3,1 | 30,3 ± 1,2 | 36,3 ± 2,5 | 25,6 ± 0,9 | 25,7 ± 1,8 |
| AG Poliinsaturados | 44,9 ± 0,5 | 31,3 ± 6,1 | 51,1 ± 2,4 | 21,9 ± 3,7 | 31,9 ± 7,8 | 40,0 ± 0,1 | 24,9 ± 9,7 | 22,2 ± 5,0 | 39,1 ± 7,9 |
| n-9 | 14,7 ± 0,7 | 10,6 ± 4,0 | 10,4 ± 0,4 | 10,2 ± 1,9 | 8,1 ± 5,6 | 14,6 ± 0,2 | 9,9 ± 1,0 | 8,8 ± 1,7 | 9,2 ± 0,6 |
| n-6 | 10,2 ± 0,3 | 11,8 ± 1,5 | 5,4 ± 0,1 | 3,0 ± 0,4 | 10,4 ± 2,2 | 10,5 ± 0,2 | 6,2 ± 1,1 | 5,7 ± 3,6 | 6,2 ± 0,7 |
| n-3 | 32,1 ± 0,3 | 26,7 ± 3,5 | 41,5 ± 3,2 | 15,5 ± 3,2 | 19,8 ± 3,2 | 26,6 ± 0,2 | 20,8 ± 2,3 | 10,8 ± 2,2 | 27,5 ± 7,8 |
| n-3 HUFA | 26,8 ± 0,2 | 24,0 ± 4,8 | 40,1 ± 3,2 | 8,7 ± 3,1 | 13,9 ± 0,9 | 19,8 ± 1,6 | 17,3 ± 1,3 | 6,5 ± 2,0 | 17,4 ± 7,7 |

Las cinco especies de peces colectadas incluyeron individuos de una amplia variedad de tallas, desde 2,5 cm hasta 20 cm. El contenido de lípidos entre los peces varió de $1,7 \pm 0,4\%$ en *Jenynsia multidentata* hasta $2,6 \pm 0,8\%$ para *Oligosarcus sp.* expresado en peso húmedo, ya que será con este valor que se corregirán las proporciones de cada presa en el modelo. Las otras tres especies de peces mostraron un contenido de lípidos similar en torno a 1,8%. Dentro de los invertebrados se pueden distinguir tres grupos respecto al tenor lipídico encontrado: Los anfípodos, *Heleobia australis* y *Erodona mactroides* tuvieron los menores valores en torno al 0,4% PH, los isópodos y *Penaeus paulensis* mostraron los valores mayores, alrededor de 2,5% PH y los demás quedaron en valores intermedios (de 0,6 a 1,4% PH), (Tabla 2.1 y 2.2).

Los 14 AG mostrados en la Tabla 2.2 comprendieron el $70,2 \pm 9,0\%$ del área total de AG en promedio de todos las presas de la base de datos. Dentro de las cinco especies de peces, *B. aurea* y *J. multidentata* fueron las especies con valores más aparatados respecto al DHA, EPA y ARA. Ambas tuvieron un bajo porcentaje de DHA, mientras que para el ARA fue menor en *B. aurea* y EPA en *J. multidentata*. Los porcentajes de 18:2n6 y 18:3n3 fueron parejos a excepción de *J. multidentata* en donde el 18:2n6 fue superior.

Dentro de los invertebrados crustáceos todos mostraron la relación característica de crustáceos de EPA:DHA>1, a excepción de *N. americana*. Los isópodos y *N. americana* tuvieron los porcentajes menores en el 18:2n6. El 18:3n3 varió entre 1,1 y 3,5% entre todos sin mayores diferencias. El ARA se mantuvo en torno al 5% a excepción de *N. americana* (2,4%) y los isópodos (3,1%). El EPA mostró porcentajes elevados característicos de crustáceos, variando entre 11,8 y 17,1%. El DHA varió entre 4,2 y 7,8%, a excepción de *N. americana* que fue muy alto (21,2%) y en los isópodos que fue bajo (1,9%).

Dentro de los otros invertebrados (anélidos y moluscos) sólo hubo dos especies en cada grupo. En cada uno de ellos, las dos especies tienen estrategias de alimentación distintas, en el caso de los moluscos uno es ramoneador (*H. australis*) el otro filtrador (*E. mactroides*), por lo que los perfiles de AG fueron distintos, principalmente en el EPA y DHA, que fueron superiores en *E. mactroides*. Las dos especies de poliquetos también mostraron diferencias en sus hábitos tróficos, uno es detritívoro (*H. similis*) y el otro carnívoro (*L. acuta*) por lo que también mostraron diferencias en su perfiles,

principalmente con valores superiores en 18:2n6, 18:3n3, 20:4n6, 20:5n3 y 22:6n3 en *H. similis*.

2.3.2 Análisis exploratorio (Análisis de agrupamiento jerárquico)

La Figura 2.3 muestra los resultados del análisis de conglomerados, utilizando todos los AG reconocidos, tomando en cuenta el promedio del perfil de cada ítem presa.

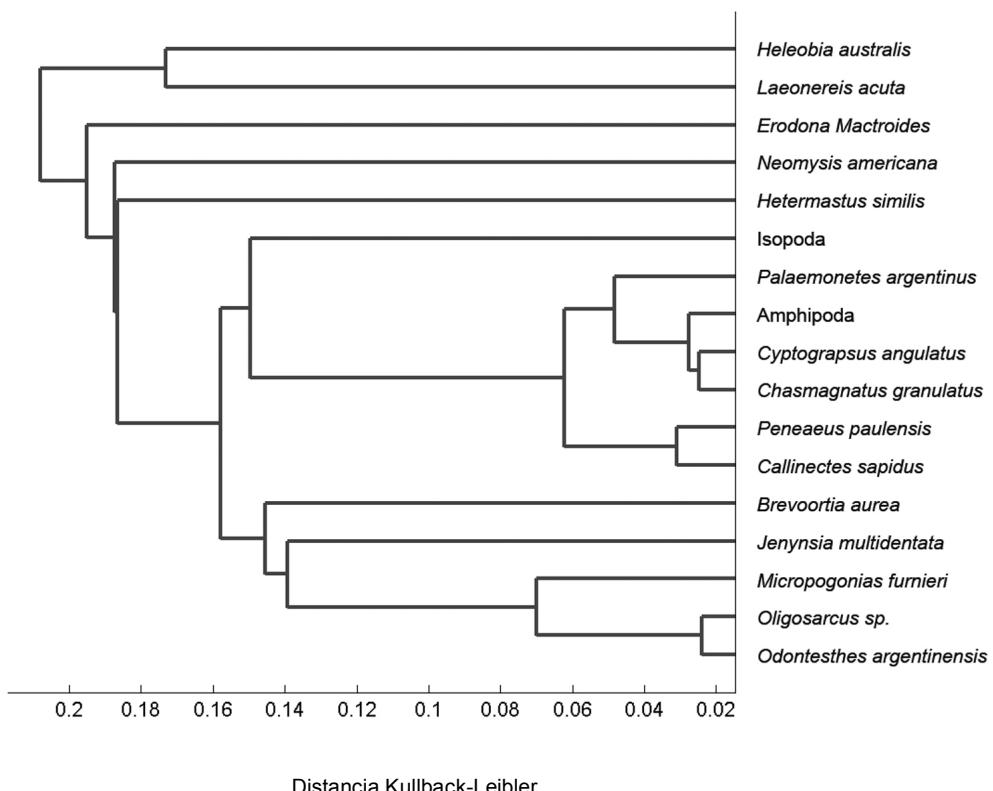


Figura 2.3. Análisis de agrupamiento jerárquico utilizando el promedio de los perfiles de ácidos grasos de todas las presas potenciales de *Paralichthys orbignyanus* en la Laguna de Rocha.

El análisis exploratorio de agrupamiento jerárquico distinguió y separó adecuadamente (respecto a las características de AG) a los 17 grupos de presas potenciales colectados, en base a su perfil de AG. Debido a esto, no fue necesario agrupar ningún ítem presa para hacer las corridas del modelo QFASA, por lo tanto el modelo tuvo para “elegir” siempre entre 17 grupos de presa.

Los diferentes grupos propuestos como presa se agruparon como se esperaba con respecto a su perfil de ácidos grasos (Tabla 2.2, Fig. 2.3). Todos los crustáceos quedaron agrupados juntos, a excepción de *N. Americana*. Esta especie mostró una

relación de DHA/EPA>1, inversa a la habitual encontrada en crustáceos, algo ya reportado por Richoux *et al.*, (2005) para esta especie. Los peces también quedaron juntos, con la distancia mínima encontrada entre *O. argentinensis* y *Oligosarcus sp. H. australis* y *L. acuta* quedaron agrupadas.

2.3.3 Estimación cuantitativa de la dieta de *P. orbignyanus* en la Laguna de Rocha

La Tabla 2.3 muestra el valor en porcentaje (promedio y desvío estándar) de cada ítem reconocido en la dieta de *P. orbignyanus* en la Laguna de Rocha estimado a través del análisis cuantitativo del perfil de ácidos grasos, con cuatro subconjuntos de ácidos grasos (A-D).

La Figura 2.4 muestra en forma gráfica la estimación cuantitativa de la dieta de *P. orbignyanus* en la Laguna de Rocha con y sin coeficientes de calibración, utilizando los subconjuntos de ácidos grasos A, B, C y D (Tabla 1.1). El modelo QFASA fue corrido con las 17 presas colectadas.

Tabla 2.3. Porcentaje de cada ítem presa en la dieta de *Paralichthys orbignyanus* en la Laguna de Rocha utilizando el modelo QFASA (expresado como promedio±desvío estándar).

| Con coeficientes | Subconjunto AG A | Subconjunto AG B | Subconjunto AG C | Subconjunto AG D |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>O. argentinensis</i> | 96,3 ± 5,9 | 98,7 ± 3,7 | 92,4 ± 11,6 | 93,9 ± 10,9 |
| <i>B. aurea</i> | 0,3 ± 0,9 | 0,1 ± 0,3 | 1,1 ± 1,8 | 0,9 ± 2,3 |
| <i>J. multidentata</i> | 0,1 ± 0,6 | | | |
| <i>N. americana</i> | 2,2 ± 5,0 | 0,6 ± 2,7 | 5,5 ± 9,6 | 4,3 ± 8,6 |
| <i>H. australis</i> | 1,2 ± 3,6 | 0,7 ± 2,8 | 1,1 ± 6,0 | 0,9 ± 4,9 |
| Sin coeficientes | | | | |
| <i>O. argentinensis</i> | 59,5 ± 11,9 | 89,6 ± 9,7 | 43,9 ± 13,2 | 51,7 ± 13,8 |
| <i>B. aurea</i> | | | | 0,3 ± 0,7 |
| <i>J. multidentata</i> | 1,2 ± 2,6 | 4,6 ± 3,9 | 18,3 ± 5,6 | 19,7 ± 4,9 |
| <i>M. furnieri</i> | 7,3 ± 3,3 | 0,7 ± 1,4 | 15,3 ± 4,7 | 6,9 ± 3,3 |
| <i>C. granulatus</i> | 0,2 ± 1,5 | | 3,2 ± 8,8 | 0,3 ± 1,5 |
| <i>N. americana</i> | 31,1 ± 10,7 | 5,1 ± 10,0 | 19,2 ± 14,3 | 16,7 ± 11,8 |
| <i>H. australis</i> | 0,7 ± 2,7 | | | 4,5 ± 5,5 |

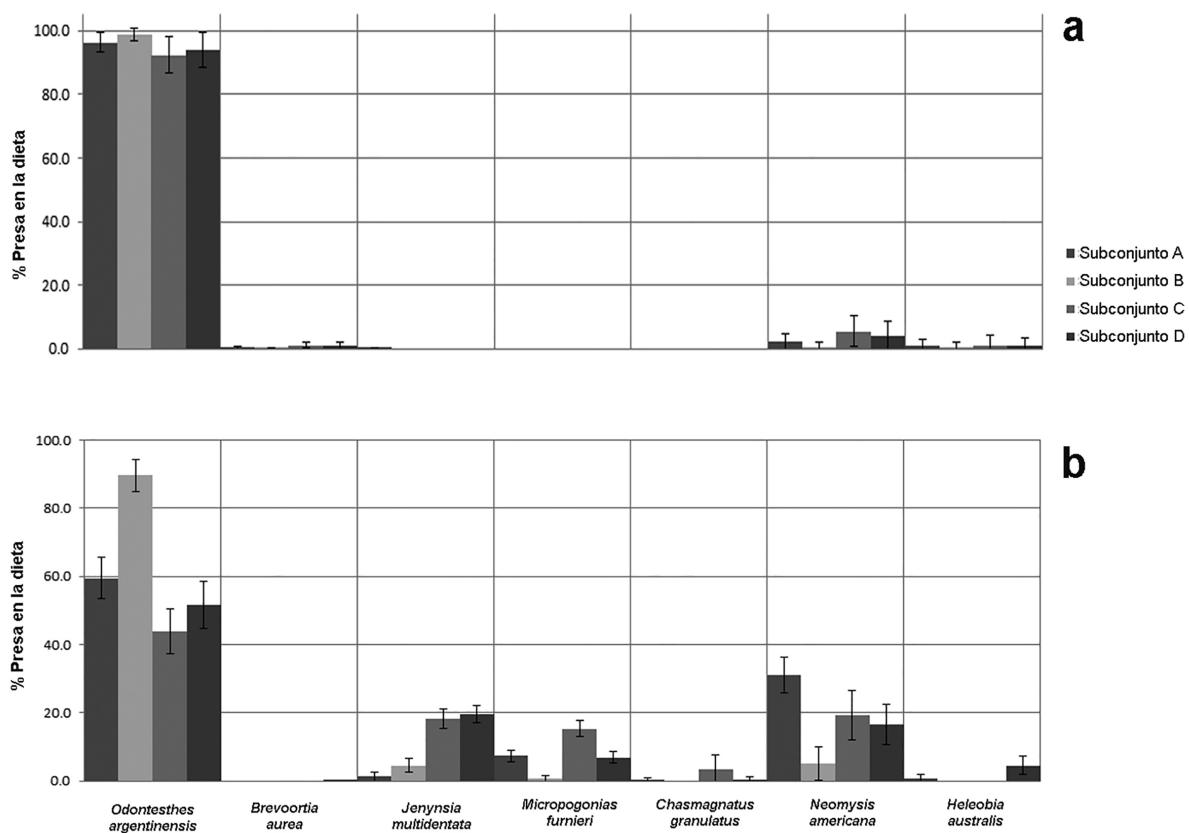


Figura 2.4. Contribución (%) de las presas identificadas en la dieta de *Paralichthys orbignyanus* en la Laguna de Rocha utilizando el análisis cuantitativo del perfil de ácidos grasos. a) Resultados corregidos por coeficientes de calibración de pejerrey semana 20, subconjuntos de AG: A, B, C y D (Tabla 1.1). b) Resultados sin corrección por coeficientes de calibración.

La presa principal (independientemente si se corrigió o no el perfil del predador con coeficientes de calibración) fue el pejerrey (*O. argentinensis*) en concordancia con los resultados obtenidos por Norbis & Galli (2004) utilizando contenidos estomacales en el mismo área de estudio.

Cuando se corrigió el perfil de AG del predador con coeficientes de calibración, el porcentaje estimado de *O. argentinensis* fue muy alto ($95,3 \pm 2,8\%$) y similar entre los 4 subconjuntos de AG ensayados, siendo superior al 92% en todos los casos (Fig. 2.4, a.). Las demás presas identificadas (*B. aurea*, *N. americana* y *H. australis*) fueron minoritarias y no mostraron mayores diferencias entre los cuatro subconjuntos de AG, siendo *N. americana* algo superior (Tabla 2.3). El uso de estos coeficientes excluyó la aparición de *J. multidentata*, *M. furnieri* y *C. chasmagnatus* en la dieta de *P.*

orbignyanus en la Laguna de Rocha. *M. furnieri* es una presa consumida en baja proporción según Norbis & Galli (2004), pudiendo constituir *J. multidentata* parte de los peces óseos no reconocidos en este mismo estudio.

La modelación del QFASA sin coeficientes de calibración (Fig. 2.4 b., Tabla 2.3) identificó mayor cantidad de presas en la dieta de *P. orbignyanus* en los 4 subconjuntos de ácidos grasos ensayados. El subconjunto de AG B (previamente identificado en el Capítulo 1 como el más idóneo para correr el modelo) fue el que mostró resultados más similares con respecto a Norbis & Galli (2004) en cuanto al porcentaje de *O. argentinensis* consumido (83,6% vs 89,6%). El porcentaje de esta presa en los demás 3 subconjuntos fue siempre menor a 60%. Con el subconjunto de AG B, se identificó también *M. furnieri* 0,7%, muy similar también al 0,9% identificado en Norbis & Galli (2004). Este subconjunto también identificó 4,5% de *J. Multidentata* que podría estar reflejando el 4,5% de peces teleósteos no identificados en el trabajo de Norbis & Galli (2004). *N. americana* destacó en este estudio representando un 5,1%, pudiendo representar aquellas presas de cuerpo blando, de digestión rápida que no es posible identificar en contenido estomacal. *B. aurea*, aunque fue identificada en la dieta de *P. orbignyanus* en algunos subconjuntos de AG, no representó un porcentaje significativo en la dieta de esta lenguado a diferencia del trabajo de Norbis & Galli (2004) en el que representó un 8,2%.

2.4 Discusión

Los lenguados de la familia Paralichthyidae son uno de los grupos de peces planos más estudiados en el mundo, debido principalmente a su gran tamaño, a ser una especie blanco de muchas pesquerías y además por contar con muchas especies que están siendo estudiadas para su desarrollo en acuicultura (Howell & Yamashita, 2005). Dentro de esta familia hay especies que pertenecen a ambos grupos de alimentación: los que se alimentan de bentos y los piscívoros (Link *et al.*, 2005). Además entre los últimos, algunas especies del género *Paralichthys* son predadores tope (Lee *et al.*, 2010) y en el grupo de los que se alimentan de bentos, varias especies juegan un papel importante en la conversión de energía de la fauna macrobentónica a niveles superiores (Link *et al.*, 2005).

Tradicionalmente, los estudios sobre hábitos de alimentación de los peces estuvieron basados en el análisis cualitativo y cuantitativo del contenido estomacal. Estos métodos suelen reflejar la última ingesta de alimentos, muchas veces identificando las presas por las partes duras que quedan de ellas y es común que se observen estómagos vacíos (Hyslop, 1980; Rindorf & Lewy, 2004). Alternativamente, han aparecido métodos basados en isótopos estables, ADN y ácidos grasos para contrarrestar estos sesgos. El análisis cuantitativo del perfil de ácidos grasos (QFASA) es uno de ellos. La robustez de este método está asociada a su capacidad para detectar presas de cuerpo blando, además de reflejar la ingesta a largo plazo (Iverson *et al.*, 2004).

Se deben cumplir algunos requisitos antes de poder aplicar este tipo de modelo en la naturaleza. Dilucidar la estrategia y el lugar de deposición de lípidos de reserva, y obtener coeficientes de calibración para quitar el sesgo en el perfil de AG de predador debido a su metabolismo específico fueron tratados en el Capítulo 1. Además se debe contar con una base de datos de perfiles de AG de las presas potenciales del predador, así como también asegurarse que éstas presas, aunque sean especies muy emparentadas, no tengan un perfil de AG muy similar. En el análisis de agrupamiento jerárquico, los perfiles de AG más parecidos entre sí fueron *O. argentinensis* y *Oligosarcus sp.* (con una distancia Kulbalck-Liebler menor a 0,03). La naturaleza exploratoria de esta técnica y la ausencia de un límite estipulado de distancia (en el QFASA) para tomar la decisión de agrupar o no las presas potenciales, llevó a que en una primera instancia el modelo fuera programado tomando las 17 presas como ítems

diferentes. El hecho de que el modelo esté identificando siempre *O. argentinensis* como presa de *P. orbignyanus* y nunca confunda *O. argentinensis* con *Oligosarcus sp.*, permite inferir que esta diferencia es lo suficientemente fuerte como para distinguir dos presas en base al perfil de ácidos grasos, para estas condiciones de partida en el modelo adaptado QFASA.

P. orbignyanus es una especie que realiza migraciones reproductivas (va al mar durante la temporada de desove) y el resto del año se encuentra en zonas estuarinas como lagunas costeras y bocas de arroyos (Radonic 2011). El presente estudio se realizó en la Laguna de Rocha y se focalizó entre Abril y Setiembre, fuera de la temporada de desove, en la temporada considerada de alimentación o de engorde dentro del estuario. Estudios previos sobre los hábitos de alimentación de *P. orbignyanus* en Uruguay y en particular en zonas salobres, mostraron que en estado adulto estos peces se alimentan tanto de peces (Norbis & Galli, 2004) como de peces y crustáceos bentónicos (Carnikian, 2006).

Los resultados obtenidos sin coeficientes de calibración (Fig. 2.4 b) fueron similares a los encontrados por otros autores (Norbis & Galli, 2004) difiriendo justamente en aquellas presas de cuerpo blando (*N. americana*), poniendo en evidencia la robustez de este tipo de modelos en detectar presas de cuerpo blando, imposibles de ver en contenidos estomacales. Por otro lado, Link *et al.*, (2005) proponen que algunos peces planos grandes pueden llegar a alimentarse de presas pequeñas, cuando la abundancia de éstas aumenta.

Los resultados de las estimaciones de dieta de *P. orbignyanus* (Tabla 2.3 a, Fig. 2.4 a) aplicando los coeficientes de calibración escogidos en el capítulo 1, muestran un sesgo respecto a la presa utilizada durante las experiencias de alimentación controlada (*O. argentinensis*). Esta especie presa, constituyó porcentajes muy altos dentro de la dieta de *P. orbignyanus* en la naturaleza, indistintamente del subconjunto de AG utilizado (92,4 a 98,7%), siendo justamente el porcentaje más alto en el subconjunto de AG B (98,7%), lo que se podría interpretar como una dieta casi selectiva para esta presa. Cabe destacar el porcentaje de *O. argentinensis* en la dieta de *P. orbignyanus* observada por otros autores (Norbis & Galli, 2004; Lopez-Cazorla & Forte, 2005; Carnikian, 2006) siempre es elevado, aunque nunca tan alto. El sesgo y la sobreestimación de la presa utilizada durante los experimentos de alimentación

controlada, ya ha sido señalado por otros autores en estudios recientes. Budge *et al.*, (2012) trabajando en peces y Rosen & Tollit (2012) trabajando en pinnípedos, han llegado a la conclusión de que existe una sobreestimación de la presa utilizada durante los experimentos de alimentación controlada para obtener los CC, en la estimación en la naturaleza de esa presa (lógicamente si la presa utilizada en condiciones experimentales se encuentra entre las presas potenciales del predador en la naturaleza). Si bien esta sobreestimación se puede observar durante la estimación en la naturaleza, no fue esperable evidenciarla durante el proceso de validación en este estudio, debido a que durante esta etapa, el aumento en el porcentaje de detección de la presa consumida se traducía en un resultado más exitoso.

Llamativamente, los resultados obtenidos sin coeficientes de calibración son similares con los encontrados por Norbis & Galli (2004) trabajando en la misma área y basados en contenido estomacal. Difirieren básicamente en las presas minoritarias, hecho que posiblemente esté reflejando la capacidad de QFASA para detectar aquellas presas que son subestimadas o difíciles de encontrar en los estómagos debido a su rápida digestión, pero que aportan a la dieta y por ende dejan huella en los reservorios de sus predadores. Iverson *et al.*, (2004) plantean que QFASA tiene la suficiente robustez para ser empleado sin coeficientes de calibración, pero el empleo de los mismos mejora y afina la estimación. Los coeficientes de calibración calculados en este estudio fueron obtenidos de experimentos donde se alimentaba los dos grupos de lenguados con solo una presa. Quizá el haber utilizado más de una presa en cada grupo podría haber matizado esta sobreestimación, pero la implementación de un experimento en donde se alimente lenguados y se pueda garantizar que éstos coman un porcentaje determinado de cada presa resulta muy difícil.

Por esta razón, los resultados obtenidos sin coeficientes de calibración y con el subconjunto de ácidos grasos B parecen los más parsimoniosos para ser propuestos como dieta de *P. orbignyanus* en la Laguna de Rocha (Tabla 2.3). *P. orbignyanus* en su fase adulta se comportó en la Laguna de Rocha como un piscívoro durante el período de estudio, alimentándose de tres especies de peces *O. argentinensis* ($89,6 \pm 9,7\%$), *J. multidentata* ($4,6 \pm 3,9\%$) y *M. furnieri* ($0,7 \pm 1,4\%$) y una especie de crustáceo *N. americana* ($5,1 \pm 10,0\%$). Si bien estos resultados fueron muy similares a los encontrados por Norbis & Galli (2004), la aparición de *N. americana* resulta

controlversial ya que genera la duda de si este pequeño crustáceo constituye realmente una presa para este lenguado de gran porte que tiene una estrategia de alimentación “sit and wait”. El hecho *N. americana* tenga un perfil de AG diferente al resto de los crustáceos, donde la relación DHA/EPA está invertida y sea el único que aparezca en la dieta, hace pensar que el modelo lo podría estar confundiendo, aunque existen otras presas más parecidas a *P. orbignyanaus* como *Oligorsacus sp.* (Fig. 2.3) y aún así no son identificadas en este modelo. Otra consideración importante y que quizá permita esclarecer este punto es que *N. americana* constituye una presa importante de *O. argentinensis* durante su fase filtradora (Sagretti & Bistoni, 2001) por lo que el modelo podría estar reflejando esta presa a través de su presa principal *O. argentinensis*, o directamente el contenido estomacal de ésta y no el consumo directo. Por otro lado podría constituir una presa real ya que existen antecedentes de que lenguados grandes comen presas chicas si su abundancia y/o disponibilidad aumentan (Link *et al.*, 2005). En este caso el modelo estaría mostrando su robustez y habilidad para detectar este tipo de presas.

CONCLUSIONES GENERALES

- ✓ Se ha demostrado que es posible inferir cuantitativamente la dieta de un pez a partir del análisis cuantitativo de perfiles de ácidos grasos. En particular mediante un modelo tipo QFASA se pudo inferir de forma exitosa la dieta de *Paralichthys orbignyanus* en la Laguna de Rocha.
- ✓ *Paralichthys orbignyanus* hace sus deposiciones de energía en el tejido subcutáneo (músculo con piel) y en el hígado.
- ✓ Con un subconjunto de apenas 21 AG, casi exclusivamente dietarios, que sólo representan la tercera parte del área de AG es posible obtener la mejor representación de la dieta.
- ✓ El uso de coeficientes de calibración para mejorar la estimación implica una sobreestimación de las presas utilizadas durante los experimentos de alimentación controlada.
- ✓ En la estimación de la dieta es posible obtener mejores resultados aplicando un modelo tipo QFASA sin coeficientes de calibración que con ellos.
- ✓ El modelo QFASA mostró suficiente robustez para aplicarse sin coeficientes de calibración en la Laguna de Rocha.
- ✓ En la laguna de Rocha durante la temporada de engorde *Paralichthys orbignyanus* se encuadra dentro del modelo de los lenguados piscívoros.
- ✓ La dieta de *Paralichthys orbignyanus* en la Laguna de Rocha se compone principalmente de *O. argentinensis* (89,6%), otras dos especies de peces *J. multidentata* (4,6%) y *M. furnieri* (0,7%) y una especie de crustáceo *N. americana* (5,1%).

PERSPECTIVAS

- ✓ Debido a que dentro de un mismo tejido los lípidos polares son mejor preservados que los lípidos neutros (Henderson & Tocher, 1987), separar estos dos grupos y trabajar sólo con los lípidos neutros del tejido subcutáneo en especies que allí hagan sus deposiciones energéticas puede resultar ventajoso.
- ✓ El hecho de que el uso de coeficientes de calibración sobreestime la presa utilizada durante los ensayos de alimentación, no significa que mitigar los efectos del metabolismo lipídico del predador no siga siendo una aspecto interesante a profundizar. Calibrar el perfil de AG de cada una de las presas, en vez del perfil de AG del predador podría constituir una solución, si bien poco práctica, más eficaz.
- ✓ Una debilidad que tienen los modelos basados en optimización es que no hay una cuantificación de la bondad de ajuste, por lo cual el proceso de validación experimental resulta un paso fundamental. Validar estos modelos en base a experimentos multipresa resulta también una estrategia interesante.
- ✓ La selección de subconjuntos de ácidos grasos parece ser un área prometedora de investigación, donde se tengan en cuenta consideraciones fisiológicas y ambientales de las especies en el momento de incluir o no ácidos grasos en los subconjuntos a correr en el modelo.
- ✓ Sería deseable captar la variabilidad en AG del predador en las estimaciones cuantitativas. Hasta ahora este modelo utiliza el promedio del perfil de AG del predador para realizar la optimización, mientras que las presas son evaluadas una a una en la base de datos, quedando representada la variabilidad del predador en función de la cantidad de sus perfiles promediados. Buscar la solución matemática y profundizar en esta área resulta otro avance significativo.
- ✓ Cruzar estos resultados con estudios de abundancia y biomasa de las presas potenciales ayudaría a comprender la estrategia de alimentación de este lenguado.

- ✓ Por último Bromaghin *et al.*, (2015) proponen que los estimadores basados en la distancia Kullback-Leibler muestran desempeños menores que los basados en la distancia Aitchison, por lo que evaluar otros tipos de distancias y comparar los resultados podría afinar la estimación. Estos autores además proponen cambiar el espacio de trabajo desde las presas hacia el predador, es decir trabajar con los promedios de AG de las presas y desplazarse hacia el espacio predador, en donde se trabaje con todos los perfiles de AG del predador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. 1980. Official Methods of Analysis. Association Official Analytical Chemist, Washington D. C. 1018 pp.
- Ackman, R.G., 1980. Fish lipids. Part 1. In: Connell, J.J. (Ed.). Advances in Fish Science and Technology. Fishing News Books Ltd, Farnham, UK, pp. 86-103.
- Alfaro, C., Thomas, F., Sergent, L., Duxbury, M., 2006. Identification of trophic interactions within an estuarine food web (northern New Zealand) using fatty acid biomarkers and stable isotopes. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 70:271-286.
- Ando, S., Mori, S., Nakamura, Y. & Sugawara, A. 1993. Characteristics of lipid accumulation types in five species of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59:1559-1564.
- Arocena, R., Conde, D., Fabian, D., Gorga, J. & Clemente, J. 1996. Calidad de agua en la Laguna de Rocha: rol de sus principales afluentes. PROBIDES/GEF. Serie: Documentos de Trabajo No 13, Rocha: 53 pp.
- Aubriot, L., Conde, D., Bonilla, S., Hein, V., Britos, A., 2005. Vulnerabilidad de una laguna costera en una Reserva de Biosfera: indicios recientes de eutrofización. En: Vila, I., Pizarro, J. (Eds.), Taller Internacional de Eutrofización de Lagos y Embalses. CYTED XVIIB. Patagonia Impresores, Chile, pp. 65-85.
- Beck, C., Iverson, S., Bowen, W. & Blanchard, W. 2007. Sex differences in grey seal diet reflect seasonal variation in foraging behaviour and reproductive expenditure: evidence from quantitative fatty acid signature analysis. *Journal of Animal Ecology*, 76:490-502.
- Bell, J., Tocher, D., Henderson, R., Dick, J. & Crampton, V. 2003. Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *Journal of Nutrition*, 133:2793-2801.
- Bergman, M., Van der Veer, H., Zijlstra, J. 1988. Plaice nurseries: effect on recruitment. *Journal of Fish Biology*, 33: 201-218.
- Bertsekas, D. 1996. Constrained Optimization and Lagrange Multiplier Methods. Athena Scientific, 395pp.
- Bessonart, M. 1997. Efecto de las relaciones EPA/DHA y EPA/AA en el cultivo larvario de la dorada (*Sparus aurata* L). Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España. 182 pp
- Bianchini, A., Wasielesky Jr., W. & Miranda, K., 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56: 453-459.
- Bianchini, A., Robaldo, R., & Sampaio, L. 2005. Cultivo do linguado (*Paralichthys orbignyanus*). En: Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Eds: Baldisserotto, B., de Carvalho Gomes, L. Editora UFSM, Brasil. 445-465.
- Bigelow, H. & Schroeder, W. 1953. Fishes of the Gulf of Maine. United States Fish & Wildlife Service, *Fishery Bulletin*, 53:1-577.
- Bolasina, S. 2011. Stress response of juvenile flounder (*Paralichthys orbignyanus*, Valenciennes 1839), to acute and chronic stressors. *Aquaculture*, 313:140-143.
- Bonilla, S., Conde, D., Aubriot, L. & Pérez, M. 2005. Influence of Hydrology on Phytoplankton Species Composition and Life Strategies in a Subtropical Coastal Lagoon Periodically Connected with the Atlantic Ocena. *Estuaries*, 28(6):884-895.

- Botto, F., Gaitán, E., Mianzan, H., Acha, M., Giberto, D., Schiariti, A. & Iribarne, O. 2011. Origin of resources and trophic pathways in a large SW Atlantic estuary: An evaluation using stable isotopes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 92:70-77.
- Bowen, W. D., 1997. Role of marine mammals in aquatic ecosystems. *Marine Ecology Progress Series*, 158:267-274.
- Bowen, W. D., 2000. Reconstruction of pinniped diets: accounting for complete digestion of otoliths and cephalopod beaks. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57:898-905.
- Braekken, O. 1959. A comparative study of vitamins in the trunk muscles of fishes. *Reports on Tecnological Research coneruing Norwegian Fish Industry* 3(8):1-51.
- Bromaghin, J., Lance, M., Elliott, E., Jeffries, S., Acevedo-Gutiérrez, A. & Kennish, J. 2013. New insights into the diets of harbor seals (*Phoca vitulina*) in the Salish Sea revealed by analysis of fatty acid signatures. *Fishery Bulletin*, 111:13-26.
- Bromaghin, J., Rode, K., Budge, S. & Thiemman, G. 2015. Distance measures and optimization spaces in quiantitative fatty acid signature analysis. *Ecology and Evolution*, 5(6):1249-1262.
- Bruslé, J. & González, G. 1996. Th estructure and function of fish liver. In: *Fish Morphology. Horizon of New Research*: Munshi, D. & Dutta, H. (Eds). Oxford and IBH Publishing. New Delhi. Ppp 78-94.
- Budge, S., Iverson, S. & Koopman, H. 2006. Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: a primer on analysis and interpretation. *Marine Mammal Science*, 22:759-801.
- Budge, S., Penney, S. & Lall, S. 2011. Response of tissue lipids to diet variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Implications for estimating diets with fatty acid analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 409:267-274.
- Budge, S., Penney, S., Lall, S. 2012. Estimating diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using fatty acid signature analyses; validation with controlled feeding studies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 69,1033-1046.
- Bye, V. 1990. Temperate marine teleosts. In: *Reproductive Seasonality in Teleosts*: Munro, A., Scott, A. & Lam, T. (Eds). Environmental Influences. CRC Press, Florida pp. 126-145.
- Carneiro, M. 1995. Reprodução e alimentação dos linguados *Paralichthys patagonicus* e *Paralichthys orbignyanus* (Pleuronectiformes: Bothidae), no Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertacão de Mestrado. Fundacão Universidade do Rio Grande do Sul, Brasil.
- Carnikián, A., 2006. Hábito alimenticio del lenguado *Paralichthys orbignyanus* en la región estuarial del Arroyo Pando. Tesis de Grado, Universidad de la República, Uruguay. 41pp.
- Cerdeira, V., Mioso, R., Macchiavello, J., Brugger, A. 1997. Ensaio de indução de desova do linguado, *Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839. Boletim do Instituto de Pesca, 24:247-254.
- Cerdeira, V. 2005. Egg development of *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). Brazilian Archives of Biology and Technology, 48(3):459-465.
- Chao, L.N., Pereira, L.E., Paez Vieira, J., Benvenuti, M., Cunha, L.P.R., 1982. Relação preliminar dos peixes estuarinos e marinos da Lagoa dos Patos e regiao costeira adjacente. Rio Grande do Sul, Brasil, Atlântica, Rio Grande, 5:67-75.
- Christie, G. W., 1982. Lipid analysis. Pergamon Press. 207pp.

- Conde, D., Aubriot, L. & Sommaruga, R. 2000. Changes in UV penetration associated with marine intrusions and freshwater discharge in a shallow coastal lagoon of the southern Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 207:19-31.
- Conde, D., Bonilla, S., Aubriot, L., De León, R. & Pintos, W. 1999. Comparison of the aerial amount of chlorophyll a of planktonic and attached microalgae in a shallow coastal lagoon. *Hydrobiologia*, 408/409: 285-291.
- Copeman, L. A., Laurel, B. J. & Parrish, C. 2013. Effect of temperature and tissue type on fatty acid signatures of two species of North Pacific juvenile gadids: A laboratory feeding study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 448:188-196.
- Costopoulos, C., & Fonds, M. 1989. Proximate body composition and energy content of plaice (*Pleuronectes platessa*) in relation to the condition factor. *Netherlands Journal of Sea Research*, 24(1):45-55.
- Cowey, C., Owen, J., Adron, J. & Middleton, C., 1976. Studies on the nutrition of marine flatfish: The effect of different dietary fatty acids on the growth and fatty acid composition of turbot, *Scophthalmus maximus*. *British Journal of Nutrition*, 36:479-486.
- Cowey, C. B., 1988. The nutrition of fish: the developing scene. *Nutrition Research Reviews*, 1:255-288.
- Dalsgaard, J., St John, M., Kattner, G., Müller-Navarra, D. C. & Hagen, W. 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in Marine Biology*, 46:225-340.
- Díaz de Astarloa, J.M. & Munroe, T.A. 1998. Systematic distribution and ecology of commercially important paralichthyid flounders occurring in Argentinean-Uruguayan waters (*Paralichthys*, Paralichthidae): An overview. *Journal of Sea Research*, 39:1-9.
- Fabre, N. & Díaz de Astarloa, J. 1996. Pleuronectiformes de importancia comercial del Atlántico Sudoccidental, entre los 34°30' y 55° S. Distribución y consideraciones sobre su pesca. *Revista Investigación y Desarrollo Pesquero*, 10: 45-55.
- Féola, F. 2009. Avances en la investigación de la reproducción del lenguado *Paralichthys orbignyanus* en la costa uruguaya. Caracterización histológica del ovario. Tesis de Grado, Universidad de la República, Uruguay. 38pp.
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226:497-509.
- Froese, R. & D. Pauly. Editors. 2015. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (08/2015).
- Gadea, J. 2011. Caracterización de la maduración gonadal de *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1842) y *Paralichthys patagonicus* (Jordan, 1889) desde el punto de vista lipídico. Tesis de Grado, Universidad de la República, Uruguay. 29pp
- Gadea, J., Bessonart, M., Magnone, L., Feóla, F. & Salhi, M. 2015. Life history traits influence in gonad composition of two sympatric species of flatfish. *Brazilian Journal of Oceanography*, 63(3):171-180.
- Gibson, R. 2005. Flatfishes: Biology and Exploitation. Blackwell Science. Oxford, UK. 391pp.
- Giménez, L., Dimitriadis, C., Carranza, A., Borthagaray, A. & Rodríguez, M. 2006. Unravelling the complex structure of a benthic community: A multiscale-multianalytical approach to an estuarine sandflat. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 68:462-472.
- Haimovici, M., Martins, A. & Vieira, P. 1996. Distribuição e abundância de teleosteo demersais sobre a plataforma continental do sul do Brasil. *Brazilian Journal of Biology*, 56:27-50.

- Harrison, P. & Parsons, T. 2000. Fisheries oceanography: an integrative approach to fisheries ecology and management. Fish and Aquatic Resources Series, 4. Blackwell Science, Oxford, 347 pp.
- Henderson, J. & Tocher, D. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progress in Lipid Research* 26:281-347.
- Hobson, K. 1993. Trophic relationships among high Arctic seabirds: insights from tissue-dependent stable-isotope models. *Marine Ecology Progress Series*, 95:7-18.
- Howell, B. & Yamashita, Y. 2005. Aquaculture and stock enhancement. In: Gibson, R. (Ed.), *Flatfishes; Biology and Exploitation*. Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 347-371.
- Hyslop, E. 1980. Stomach contents: a review of methods and their application. *Journal of Fish Biology*, 17(4): 411-429.
- Iverson, S. 1993. Milk secretion in marine mammals in relation to foraging: Can milk fatty acids predict diet? *Symposia of the Zoological Society of London*, 66:263-291.
- Iverson, S. 2009. Tracing aquatic food webs using fatty acids: from qualitative indicators to quantitative determination. In: Arts, T., Brett, M., Kainz, M. (Eds) *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer, New York, pp 281-307.
- Iverson, S., Field, C., Bowen, W. & Blanchard, W. 2004. Quantitative fatty acid signature analysis: a new method of estimating predator diets. *Ecological Monographs*, 74:211-235.
- Iverson, S., Springer, A. & Kitaysky, A. 2007. Seabirds as indicators of food web structure and ecosystem variability: qualitative and quantitative diet analysis using fatty acids. *Marine Ecology Progress Series*, 352:235-244.
- Jobling, M. 2003. Do changes in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fillet fatty acids following a dietary switch represent wash-out or dilution? Test of a dilution model and its application. *Aquaculture Research*, 34: 1215-1221.
- Jobling, M. & Breiby, A. 1986. The use and abuse of fish otoliths in studies of feeding habits of marine piscivores. *Sarsia*, 71: 265-274.
- Jobling, M., Larsen, A.V., Andreassen, B., Sigholt, T. & Olsen, R.L. 2002. Influence of a dietary shift on temporal changes in fat deposition and fatty acid composition of Atlantic salmon post-smolt during the early phase of seawater rearing. *Aquaculture Research*, 33:875-889.
- Jorcín, A. 1996. Distribución, abundancia y biomasa de *Erodona mactroides* (Mollusca, Bivalvia, Daudin 1801), en la Laguna de Rocha (Dept. de Rocha, Uruguay). *Brazilian Journal of Biology*, 56:155-162.
- Katona, S. & Whitehead, H. 1988. Are cetacea ecologically important? *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, 26:553-568.
- Kinoshita, H., Bessonart, M., Gadea, J., Magnone, L., Féola, F. & Salhi, M. 2009. Desarrollo morfológico del huevo y la larva del lenguado *Paralichthys orbignyanus*. Boletín del Instituto de Investigaciones pesqueras, N°27 p. 67-69.
- Kirsch, P., Iverson, S., Bowen, W., Kerr, S., Ackman, R. 1998. Dietary effects on the fatty acid signature of whole Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55:1378-1386.
- Koch, P., Heisinger, J., Moss, C., Carlson, R., Fogel, M. & Behrensmeyer, A. 1995. Isotopic tracking of change in diet and habitat use in African elephants. *Science*, 267:1340-1343.
- Koutsikopoulos, C. & Lacroix, N. 1992. Distribution and abundance of sole (*Solea solea* (L.)) eggs and larvae in the Bay of Biscay between 1986 and 1989. *Netherlands Journal of*

- Sea Research, 29:81-91.
- Lee, S., Aydin, K., Spencer, P., Wilderbuer, T. & Zhang, C. 2010. The role of flatfishes in the organization and structure of the eastern Bering Sea ecosystem. *Fisheries Science*, 76:411-434.
- Link, J., Fogarty, M. & Langton, R. 2005. The trophic ecology of flatfishes. In: Gibson, R. (Ed.), *Flatfishes; Biology and Exploitation*. Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 185-212.
- López-Carlota, A. & Forte, S. 2005. Food and feeding habits of flounder *Paralichthys orbignyanus* (Jenyns, 1842) in Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Hydrobiologia*, 549:251-257.
- Love, R. 1970. The chemical biology of fishes. Academic Press, London and New York. 550 pp.
- Luquet, P. & Watanabe, T. 1986. Interaction "nutrition-reproduction" in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 2:121-129.
- Magnone, L., Gadea, J. & Bessonart, M. 2009. Balance de ácidos grasos entre músculo y gónadas durante el ciclo reproductivo de *Paralichthys orbignyanus* 2da. Conferencia Latinoamericana sobre cultivo de peces nativos. Chascomús, Argentina. Noviembre, 2009. p. 102.
- Mead, J. & Kayama, M. 1967. Lipid metabolism in Fish. En: Stasby, M. (Ed), *Fish oils*. Avi Publ. Ltd., Wesport, Connecticut. pp 289-299.
- Mellito da Silveira, M., Brahm Cousin, J., Haimovici, M. 1995. Estrutura ovárica e testicular do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Atlântica*, Río Grande, 17:135-152.
- Meynier, L., Morel, P., Chilvers, B., Mackenzie, D. & Duignan, P. 2010. Quantitative fatty acid signature analysis on New Zealand sea lions: model sensitivity and diet estimates. *Journal of Mammalogy*, 91(6):1484-1495.
- Milessi, A., Calliari, D., Rodríguez-Graña, L., Conde, D., Sellanes, J. & Rodríguez-Gallego, L. 2010. Trophic mass-balance model of a subtropical coastal lagoon, including a comparison with a stable isotope analysis of the food-web. *Ecological Modelling*, 221: 2859-2869.
- Nanton, D., Lall, S., Ross, N. & McNiven, M. 2003. Effect of dietary lipid level on fatty acid β-oxidation and lipid composition in various tissues of haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 135: 95-108.
- Nanton, D., Vegusdal, A., Rørå, A., Ruyter, B., Baeverfjord, G. & Torstensen, B. 2007. Muscle lipid storage pattern, composition, and adipocyte distribution in different parts of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed fish oil and vegetable oil. *Aquaculture*, 265: 230-243.
- Neubauer, P. & Jensen, O. 2015. Bayesian estimation of predator diet composition from fatty acids and stable isotopes. *PeerJ* 3:e920.
- Nión, H., Ríos, C. & Meneses, P. 2002. Peces del Uruguay. Lista sistemática y nombres comunes. DINARA. INFOFESCA. Montevideo, Uruguay. 115pp.
- Norbis, W. & Galli, O. 2004. Hábitos de alimentación del lenguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes 1842) en una laguna costera somera del Atlántico Sur: Rocha, Uruguay. *Ciencias Marinas*, 30:619-626.
- Norbis, W. 2000. Estudios sobre la población de camarón rosado (*Penaeus paulensis*) en las lagunas costeras de la Reserva de Biósfera Bañados del Este. PROBIDES-Rocha, Uruguay. Documento de Trabajo No. 28, 40pp.
- Nordstrom, C., Wilson, L., Iverson, S. & Tollit, D. 2008. Evaluating quantitative fatty acid signature analysis (QFASA) using harbour seals *Phoca vitulina richardsi* in captive feeding studies. *Marine Ecology Progress Series*, 360: 245-263.

- Olsson, D., Pesamosca, P., Saona, G., Forni, F., Vizziano, D., Verocai, J. & Norbis, W. 2003. Análisis del contenido estomacal de la corvina (*Micropogonias furnieri*; Desmarest, 1823) en la Laguna de Rocha-Uruguay. Act VII Jorn Zool Uruguay. Sociedad Zoología del Uruguay, p 125.
- Paine, R. 1980. Food webs: linkage, interaction strength and community infrastructure. *Journal of Animal Ecology*, 49:667-685.
- Parrish, C., Abrajano, T., Budge, S., Helleur, R., Hudson, E., Pulchan, K. & Ramos, C. 2000. Lipid and phenolic biomarkers in marine ecosystems: analysis and applications. In: Wangersky, P. (Ed.), *The Handbook of Environmental Chemistry*, Part D, Marine Chemistry. Springer, Berling, Heidelberg, pp.193-233.
- Pearcy, W., & Hancock. 1978. Feedin habits of Dover sole, *Microstomus pacificus*. Rex sole *Glyptocephalus zachirus*, slender sole, *Lyopsetta exilis*, and Pacific sanddab *Citharichthys sordidus*, in a region of diverse sediments and bathymetry off Oregon. US Fishery Bulletin, 76:641-651.
- Petersen, S., Dahl, T., Scout, C., Sargent, J., Gulliksen, B., Kwasniewski, S., Hop, H. & Millar, R. 2002. Lipid biomarkes and trophic linkages between ctenophores and copepods in Svalbard waters. *Marine Ecology Progress Series*, 227:187-194.
- Pimm, S., Lawton, J. & Cohen, J. 1991. Food web patterns and their consequences. *Nature*, 350:669-674.
- Pintos, W., Conde, D., De León, R., Cardezo, M., Jorcín, A. & Sommaruga, R. 1991. Some limnological characteristics of Laguna de Rocha (Uruguay). *Revista Brasileira de Biología*, 51:79-84.
- Podrazhanskaya, S. & Yarzhombek, A. 1970. Weight of Baltic cod and Atlantic grenadier liver as an index of fat content of the organism. Collected Papers of Young Scientists, VNIRO, Moscow, 4: 88-96.
- Radonic, M., Müller, M., López, A., Bambil, G., Spinedi, M. & Boccanfuso, J. 2007. Improvement in flounder *Paralichthys orbignyanus* controlled spawning in Argentina. *Ciencias Marinas* 33:187-196.
- Radonic, M. 2011. Biología reproductiva del lenguado *Paralichthys orbignyanus*: Maduración y potencial reproductivo en ejemplares cultivados y salvajes. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina. 204 pp.
- Ricker, W. 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Bulletin Fisheries Research. Board of Canada*. pp191- 382
- Richoux, N., Deibel, D., Thompson, R. & Parrish, G. 2005. Seasonal and developmental variation in the fatty acid composition of *Mysis mixta* (Mysidacea) and *Acanthostepheia malmgreni* (Amphipoda) from the hyperbenthos of a cold-ocean environment (Conception Bay, Newfoundland). *Journal of Plankton Research*, 37:719-733.
- Rindfort, A. & Lewy, P. 2004. Bias in estimating food comsumption of fish by stomach-content analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61:2487-2498.
- Rivera-Prisco, A., García De La Rosa, S. & Díaz de Astarloa, J. 2001. Feeding Ecology of Flatfish Juveniles (Pleuronectiformes) in Mar Chiquita Coastal Lagoon (Buenos Aires, Argentina). *Estuaries*, 24(6A):917-925.
- Robaldo, R. 2003. Estudo comparativo da reprodução do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) no ambiente e em cativeiro. Tesis Doctoral. Universidade Federal Do Rio Grande, RS, Brasil. 182 pp.
- Robaldo, R., Pereira, Jr., J., Sampaio, L., Kutter, V. & Bianchini, A. 2002. Ovoposiçao e desenvolvimento inicial de *Caliugus sp.* (Copepoda: Caligidae) parasita de juvenil do

- linguado *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) en cautiverio. Atlântica, Rio Grande, 24(2):85-88.
- Rodriguez-Graña, L., Calliari, D., Conde, D., Sellanes, J. & Urrutia, R. 2008. Food web of a SW Atlantic shallow coastal lagoon: spatial environmental variability does not impose substantial changes in the trophic structure. *Marine Ecology Progress Series*, 362:69-83.
- Rosen, D. & Tollit, D. 2012. Effects of phylogeny and prey type on fatty acid calibration coefficient in three pinniped species: implications for the QFASA dietary quantification technique. *Marine Ecology Progress Series*, 467:263-276.
- Rossi, S., Sabatés, A., Latasa, M. & Reyes, E. 2006. Lipid biomarkers and trophic linkages between phytoplankton, zooplankton and anchovy (*Engraulis encrasicolus*) larvae in the NW Mediterranean. *Journal of Plankton Research*, 28:551-562.
- Sagretti, L. & Bistoni, M. 2001. Feeding of *Odontesthes bonaerensis* (Cuvier & Valenciennes 1835) (Atheriniformes, Atherinidae) in the saline lake of Mar Chiquita (Cordoba, Argentina). *Gayana*, 65:37-42.
- Salhi, M., Bessonart, M., 2013. Growth, survival and fatty acid composition of *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824) larvae fed on artificial diet alone or in combination with *Artemia nauplii*. *Aquaculture Research*, 44:41-79.
- Sampaio, L., Bianchini, A. & Cerqueira, V. 2001. Growth of juvenile Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, cultured at different salinities. *Journal of Applied Aquaculture*, 11: 67-75.
- Sampaio, L., Freitas, L., Okamoto, M., Louzada, L., Rodrigues, R. & Robaldo, R. 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. *Aquaculture*, 262:340-346.
- Sampaio, L., Robaldo, R. & Bianchini, A. 2008: Hormone- induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Aquaculture Research*, 39:712-717.
- Sampaio, L. & Bianchini, A. 2002. Salinity effects on osmorregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 269:187-196.
- Santana, O. & Fabiano, G. 2001. Medidas y mecanismos de administración de los recursos de las lagunas costeras del litoral atlántico del Uruguay (Lagunas José Ignacio, Garzón, de Rocha y de Castillos). En: Rey M, Amestoy, F., Arena, G. (Eds) Plan de investigación pesquera INAPE–PNUD URU/92/003, DINARA, Montevideo.
- Sargent, J. & Henderson, R. 1995. Marine (n-3) polyunsaturated fatty acids. In: Hamilton. R. (Ed.). *Developments in Oils and Fats*. Blackie Academic and Professional, London. pp. 32-65.
- Sargent, J. 1995. Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. In: Bromage, N., Roberts, R. (Eds.). *Broodstock Management and Egg and Larval Qualit*. Blackwell Science, Oxford, pp. 353-372.
- Sargent, J., Tocher, D. & Bell, J. 2002. The lipids. In: Fish Nutrition, Halver, J., Hardy, R. (Eds.). Academic Press, San Diego, pp. 181-257.
- Schoener, T. 1971. Theory of feeding strategies. *Annual Review of Marine Science*, 2:369-404.
- Sheridan, M. 1988. Lipid dynamics in fish: Aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 90(4):679-690.
- Sheridan, M. 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 107(4):495-508.

- Shevchenko, V. 1971. On the dynamics of fat accumulation and growth of North Sea haddock during the spring-summer period. Collected Papers by Young Scientists, VNIRO, Moscow, 7:163-170.
- Sih, A., Englund, G. & Wooster, D. 1998. Emergent impacts of multiple predators on prey. *Trends in Ecology & Evolution*, 13:350-355.
- Skonberg, D., Rasco, B. & Dong, F. 1994. Fatty acid composition of salmonid muscle changes in response to high oleic acid diet. *Journal of Nutrition*, 124:1628-1638.
- Sommaruga, R. & Conde, D. 1990. Distribución de la materia orgánica en los sedimentos recientes de la laguna de Rocha (Uruguay). *Atlantica*, 12:35-44.
- Stephens, D. & Krebs, J. 1986. Foraging theory. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA. 247 pp.
- Thiemann, G., Iverson, S. & Stirling, I. 2008. Polar bear diets and arctic marine food webs: insights from fatty acids analysis. *Ecological Monographs*, 78:591-613.
- Tokranov, A. & Maksimenkov, V. 1994. Feeding of the starry flounder, *Platichthys stellatus*, in the Bol'shaya River estuary (western Kamchatka). *Journal of Ichthyology*, 34:76-83.
- Tucker, S., Bowen, W., Iverson, S., Blanchard, W. & Stenson, G. 2009. Sources of variation in diets of harp and hooded seals estimated from quantitative fatty acid signature analysis (QFASA). *Marine Ecology Progress Series*, 384:287-302.
- Turchini, G., Torstensen, B. & Ng, W. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1:10-57.
- Vaz Ferreira, R. Peces del Uruguay. Aljanati, D., Benedeto, M. Marsillo H. (Eds). Colección Nuestra Tierra, Nº 23. 72 pp.
- Vinogradov, V. 1985. Fat Content of Muscle, Gonads and Liver of Silver Hake (*Merluccius bilinearis*) and Red Hake (*Urophycis chuss*) from the Continental Shelf off Southern New England in Late Winter. NAFO Scientific Council Studies 8:57-59.
- Vitancurt, J. & Fagetti, C. 1995. Comunidades de pescadores del departamento de Rocha: informe diagnóstico, recomendaciones y avances para un proyecto de desarrollo Rocha, Uruguay. Probides. Serie Documentos de Trabajo, Nº 1 49 pp.
- Vitancurt, J. & Olazábal, A. 2002. Proyecto de desarrollo de las áreas protegidas. Laguna Garzón y Rocha. Bases para un plan de manejo. PROBIDES. Documento de Trabajo No. 44. 48 pp.
- Wang, S., Hollmén, T. & Iverson, S. 2010. Validating quantitative fatty acids signature analysis to estimate diets of spectacled and Stellers eiders (*Somateria fischeri* and *Polyictica stelleri*). *Journal of Comparative Physiology Part B*, 180:125-139.
- Wasielesky, Jr., W., Bianchini, A., Santos, M. & Poersch, L., 1997. Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. *Journal of the World Aquaculture Society*, 28: 202-204.
- Wasielesky Jr., W., Miranda, K. & Bianchini, A. 1995. Tolerância do linguado *Paralichthys orbignyanus* à salinidade. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 38: 385-395.
- Werner, E. & Gilliam, J. 1984. The ontogenetic niche and species interactions in size-structured populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15:393-425.
- Whitfield, A. 1998. Biology and Ecology of Fishes in Southern African Estuaries. Ichthyological Monographs of the J. L. B. Smith Institute of Ichthyology, No. 2. Grahamstown, South Africa. 223 pp.

Yaragina, N. & Marshall, C. 2000. Trophic influences on interannual and seasonal variation in the liver condition index of Northeast Arctic cod (*Gadus morhua*). ICES Journal of Marine Science, 57:42-55.

ANEXO I

PROTOCOLO:

Biopsia muscular dorsal en *Paralichthys orbignyanus*

Dr. Martin Bessonart

Lic. Larisa Magnone

1 día antes del procedimiento de cirugía los ejemplares son tratados con antibiótico. (Oxitetraciclina 0,02g/l de agua de mar y se deja 1 hora sin recambio de agua, luego se abre circuito de agua.

✓ Procedimiento:

- Los animales son puestos en un baño con anestésico durante 5 o 6 minutos.

- Anestesia (Benzocaina)

Se agregan 50 ml de solución madre (0,1g/ml) en 100 litros de agua de mar.

✓ Biopsia

Antes de la cirugía a los animales se les pone un paño oscuro sobre los ojos. Luego se efectúa la extracción de tejido muscular dorsal. Primero con un bisturí se quitan las escamas de la zona en donde se va a hacer la incisión, y después se hacen dos cortes paralelos de aproximadamente 0,5 cm, después con la ayuda de una pinza se realizan los demás cortes para obtener un corte de aproximadamente 0,5x0,5x0,5cm (0,5 g de músculo con piel).

✓ Desinfección y curación

Se contiene la hemorragia con una gasa durante unos segundos, luego hace una cauterización en la zona de la herida. Luego se agrega iodofón en y se agrega ungüento de propóleo cubriendo y llenando toda la zona.

✓ Antibiótico (1 semana)

Luego del procedimiento quirúrgico los peces son transportados a un tanque con antibiótico, oxitetraciclina 0,02g/l de agua de mar y se deja 1 hora sin recambio de agua, luego se abre circuito de agua.

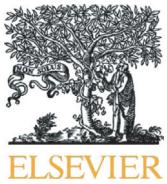
El tratamiento con antibiótico sigue durante 7 días (oxitetraciclina 0,01g/l con recambio de agua constante)



Individuo al que se le está realizando una biopsia de tejido muscular dorsal



Vista de un individuo al que se le había realizado una biopsia 1 mes atrás (cicatrizada)



Diet estimation of *Paralichthys orbignyanus* in a coastal lagoon via quantitative fatty acid signature analysis



Larisa Magnone ^{a,*}, Martin Bessonart ^{a,b}, Martín Rocamora ^c, Juan Gadea ^a, María Salhi ^a

^a Laboratorio de Recursos Naturales, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, CP 11400 Montevideo, Uruguay

^b Estación Experimental de Cultivos Marinos y Acuicultura, Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA) Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP),

Parque Nacional Cabo Polonio s/n, Uruguay

^c Departamento de Procesamiento de Señales, Instituto de Ingeniería Eléctrica, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Julio Herrera y Reissig 565, CP 11300 Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2014

Received in revised form 6 October 2014

Accepted 7 October 2014

Available online xxxx

Keywords:

QFASA

Paralichthys orbignyanus

Fatty acids

Coastal lagoons

Diet

Flatfish

ABSTRACT

Quantitative fatty acid analysis (QFASA) is a statistical model designed to quantitatively estimate predator diets using fatty acid (FA) signatures among the predator and its potential prey. QFASA estimated the diet of a migratory flatfish *Paralichthys orbignyanus* over its fattening stage in the Rocha lagoon (a semi-closed estuary) where all prey available to this top predator species are well known. A 20-week controlled feeding trial obtained calibration coefficients (CC) for *P. orbignyanus* fed two types of prey (silverside and menhaden). Several subsets of FA were tested in order to elucidate which is the most suitable for applying QFASA to this species. QFASA was applied to all CC and FA subsets to validate the model. The model predicts better the consumed diet with silverside CC than with menhaden CC. The subset which best adjusts the diet over the validation process, includes approximately 34% of total FA, containing mainly dietary FA. The diet estimation in nature for *P. orbignyanus* varied according to whether the model is applied with or without CC. When the diet was estimated without CC, results were similar to those based on stomach content analysis (reported in previous studies); it fed mainly on silverside (~88%), but also some minor soft-body species that are only evident using this kind of methodology (QFASA). When the diet was estimated with silverside CC, a higher presence of silverside (~97%) was observed. These results seem to indicate a tendency to overestimate the presence of the item used as prey for CC calculations.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Continental shelves and their associated estuaries are among the most productive ecosystems in the world (Day et al., 1981), where major fishery resources, including flatfish (Munroe, 2005) are located. Estuaries constitute areas used by several species as permanent or transitory habitats for reproduction, migration, feeding and nursery (Elliott and Hemingway, 2002). Establishing and quantifying trophic relationships between the species of an ecosystem is of primary importance to understand the ecosystem functioning (Connan et al., 2007).

Paralichthyidae flatfishes constitute important commercial and recreational fisheries throughout the Atlantic, from the deep Arctic to the coasts of southern Africa and South America (Díaz de Astarloa,

2002). They are the most productive demersal fisheries in the world from the commercial point of view and Paralichthyidae flatfishes are by far the most valuable fish per unit weight landed. (Díaz de Astarloa and Munroe, 1998). In Uruguay, there are three species of flatfishes, but only one (*Paralichthys orbignyanus*) inhabits estuaries. This flatfish occurs from Río de Janeiro, Brazil, to San Matías Gulf, Argentina (Fabré and Díaz de Astarloa, 1996). It is categorized as a eurihaline and euritherm species (López Cazorla, 2005) and in summer it is captured mainly in coastal areas (López Cazorla, 1987). *P. orbignyanus*, like other North Atlantic flatfishes, is a catadromous fish spawning in marine water, but its juveniles migrate towards coastal lagoons (Bergman et al., 1988; Koutsikopoulos and Lacroix, 1992; Whitfield, 1998) and fatten there (Robaldo, 2003).

Across the Atlantic shoreline of Uruguay there are several coastal lagoons and stream mouths where *P. orbignyanus* is found from juvenile to adult stages throughout the year (Rivera Prisco et al., 2001). The Rocha Lagoon is a sand flat coastal lagoon that, as an estuarine environment, serves as a nursery and sheltering area for migrating birds and fish (Mianzan et al., 2001). In recent years, increasing eutrophication of the lagoon has been observed (Aubriot et al., 2005) related to the main activities of the land use: extensive cattle raising and agriculture. Today, this ecosystem belongs to a conservation area where

Abbreviations: CC, calibration coefficients; DHA, docosahexaenoic acid; EFA, essential fatty acids; EPA, eicosapentaenoic acid; FA, fatty acids; FAMES, fatty acid methyl esters; HIS, hepatosomatic index; HUFA, high unsaturated fatty acids; KL, Kullback–Liebler; MUFA, monounsaturated fatty acids; PER, predator energy reservoir; PUFA, polyunsaturated fatty acids; QFASA, quantitative fatty acid signature analysis; SAFA, saturated fatty acids.

* Corresponding author.

E-mail addresses: larisa@fcien.edu.uy (L. Magnone), martinb@fcien.edu.uy (M. Bessonart), rocamora@ing.edu.uy (M. Rocamora), juanluisgadea@gmail.com (J. Gadea), msalhi@fcien.edu.uy (M. Salhi).

P. orbignyanus – which has been reported as a top predator (Norbis and Galli, 2004; Rodriguez-Graña et al., 2008) – represents a high proportion of the captures by local fishermen.

Top predators play an important role in determining the structure and functioning of ecosystems (Bowen, 1997). The dynamics of predator-prey relationships, the structure of food webs, and the foraging behavior of individuals are key factors to understand the functioning of these types of areas (Pimm et al., 1991; Schoener, 1971; Sih et al., 1998), which is crucial for their management (King et al., 1995).

The common way to address the study of trophic relationships is by producing accurate estimates of the diet of predators. Currently, the diet of *P. orbignyanus* has been estimated using the classic method of stomach content analysis (Norbis and Galli, 2004). Although often used for determining diets, such estimates can be biased since soft-bodied prey are rapidly digested whereas prey with hard parts can be overestimated (Bowen, 2000). In addition, this estimate provides only a snapshot of the last meal of an animal. For these reasons, methods to assess the feeding habits based on fatty acid (FA) signatures seem to be a promising alternative. They can provide new insight into the long-term diet of species taking advantage of FA as trophic markers. Moreover, the detection of soft-bodied prey can be improved and the sampling process can be undertaken while keeping the predator alive.

Fatty acids have been extensively used in qualitative studies about trophic relationships in food webs (Dalsgaard et al., 2003) based on the demonstrated influence of dietary FA on predator fat stores (Colby et al., 1993; Kanazawa et al., 1979; Kirsch et al., 1998; Raclot et al., 1998; Rouvinen and Kiiskinen, 1989). Specifically the concept of individual lipid biomarkers has been focused on mainly in the linkage between organisms at lower levels of the food webs (Falk-Petersen et al., 2002; John and Lund, 1996; Leveill et al., 1997; Mansour et al., 1999). Recently, Iverson et al. (2004) have developed a new method to quantitatively estimate top predators' long-term diet using fatty acid signatures (quantitative fatty acid signature analysis, QFASA). The technique involves the use of a statistical model to determine the combination of prey FA signatures that most closely resembles the predator FA stores to infer its diet. The predator differential metabolism of FA is taken into account by introducing calibration coefficients (CC) in the model, which are obtained from controlled feeding experiments. These experiments not only provide correction factors that allow a more accurate quantitative estimation, but they also provide a rigorous validation of the method. The determination of how long these experiments have to last to truly reflect the diet in the predator fat storage tissue is critical (Budge et al., 2006). Several studies have been conducted to determine calibration coefficients for birds and mammals (Iverson et al., 2007; Nordstrom et al., 2008; Rosen and Tollit, 2012; Wang et al., 2010; Williams et al., 2009) but, in regard to fish, only Atlantic salmon has been studied (Budge et al., 2011, 2012). A careful selection of the predator fat store tissue to use in QFASA has been shown to be of crucial importance (Budge et al., 2006; Iverson, 2009). The adipose tissue is usually selected in vertebrates as it should experience a rapid turnover in response to dietary lipid intake. Fish, despite being vertebrates, have their lipid stores in muscle with skin, viscera or liver, and it is well known that the fatty acid composition of these tissues in fish largely resembles the fatty acid composition of the diet (Ackman, 1980; Jobling, 1993; Shearer, 1994).

Although qualitative FA techniques have been used to infer foraging ecology in fish (Elsdon, 2010; Stowasser et al., 2009; Young et al., 2010), to this date, to our knowledge, quantitative analysis has not been performed or validated in this group of vertebrates. The QFASA method was designed and assessed for upper trophic level endothermic vertebrates (Iverson et al., 2007; Nordstrom et al., 2008; Thiemann et al., 2008; Tucker et al., 2009; Wang et al., 2010), but it has not yet been applied to lower vertebrates (Iverson, 2009).

The aim of this work was to obtain a quantitative estimation of the diet of a flatfish (*P. orbignyanus*) in an estuarine coastal lagoon by applying the QFASA. Additionally, we aimed to determine calibration

coefficients and validate the model for this species under controlled experimental conditions.

2. Materials and methods

2.1. Sampling site and sample database

Field sampling for wild prey and predator fish was conducted in Rocha Lagoon, Uruguay (Fig. 1). Over the validation process of the model, fish were housed and managed in the Experimental Institute of Marine Aquaculture of DINARA (Department of Rocha, Uruguay).

2.2. Site

Rocha lagoon is a brackish, shallow, and microtidal coastal lagoon (mean depth = 0.6 m, area = 72 km²) located on the Atlantic coast of South America (34° 38' S, 54° 17' W) (Sommaruga and Conde, 1990), included in a protected area of MaB-UNESCO. At irregular intervals of time, a connection with the ocean opens through a restricted inlet in the southernmost region of the lagoon, allowing the migration of many species, including *P. orbignyanus*, and producing a north-south salinity gradient (Conde et al., 2000).

2.3. Wild *P. orbignyanus*

A total of 33 adult *P. orbignyanus* (23 females and 10 males) obtained at Rocha Lagoon with the help of local fishermen from April 2008 to October 2010, were measured and weighed (44.0 ± 8.1 cm and 1.2 ± 0.5 kg) and sampled for lipid and fatty acid analysis. Samples were obtained from gonads, liver and a piece of upper dorsal muscle with skin (sampled together to include subdermal lipids) and stored at -20 °C. The livers of the fish were also weighed to obtain the hepatosomatic index (HSI), calculated as: [liver weight (g) / fish weight (g)] × 100.

2.4. Potential prey

Based on available information about the items cited as prey for *P. orbignyanus* according to Rivera Prisco et al. (2001), Norbis and Galli (2004), López Cazorla (2005) and Rodriguez-Graña et al. (2008), a comprehensive sampling of the cited prey and non-cited potential prey of *P. orbignyanus* was carried out. Prey samples were collected from April 2008 to October 2010 at Rocha lagoon using gill nets, seine nets, corer samples, dredge samples and manual collections. A total of 17 dietary items were collected and identified to the lowest possible taxonomic level.

Prey, with the exception of *Heteromastus similis*, were counted, measured and weighed (total length with 1 mm precision and wet weight with 0.0001 g precision). As *P. orbignyanus* displays cannibalism, juveniles of this species could be considered as a prey item. However, this option was not considered in order to avoid artificial noise in the diet estimation, due to the resemblance between this prey and the predator FA profile.

2.5. Lipids and FA analysis

All samples for biochemical procedures were stored at -20 °C until analysis. Lipid extraction and quantification was made in duplicate according to Folch et al. (1957). To generate the predator profile, lipids were extracted from freeze-dried and homogenized dorsal muscle with skin. In the case of potential prey, whole organisms were freeze-dried and homogenized prior to lipid extraction. FA methyl esters (FAMEs) of total lipids of all samples were methylated by transesterification with H₂SO₄ in methanol solution (Christie, 1982). FAMEs were separated using gas chromatography (Hewlett Packard 5890) equipped with a flame ionization detector, a Supelcowax fused silica capillary column (30 m 0.32 mm ID, Supelco, USA) and nitrogen as a carrier gas. Samples

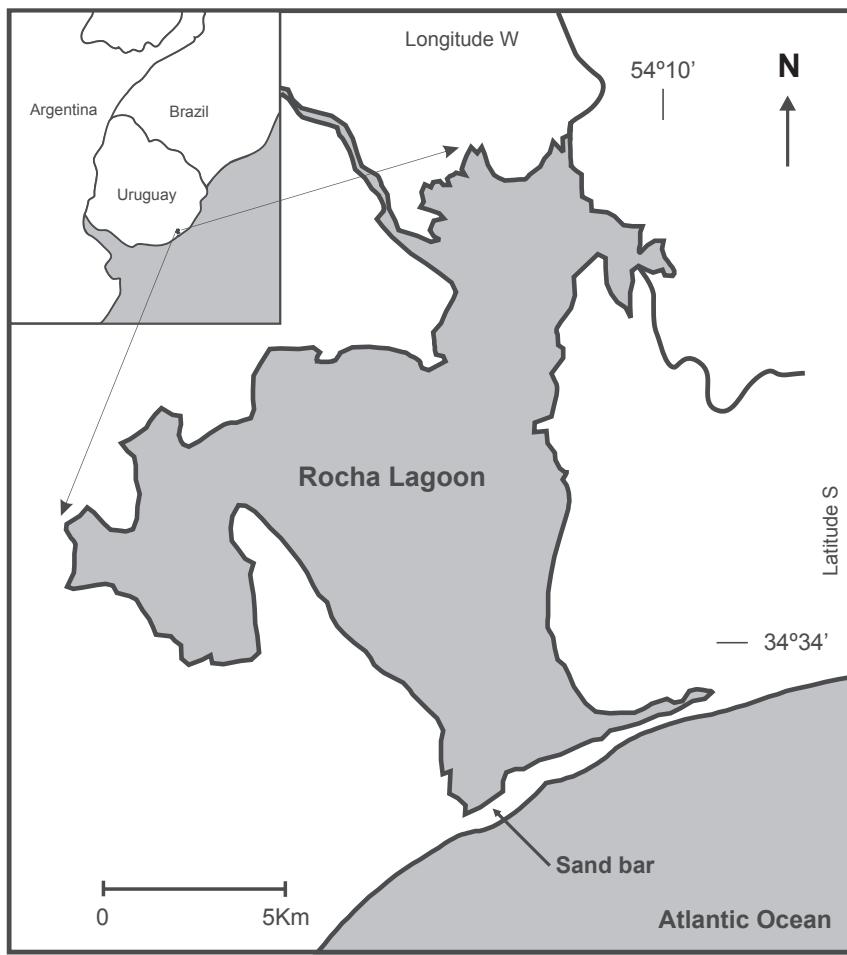


Fig. 1. Study area of *Paralichthys orbignyanus* for the quantitative fatty acid signature analysis of diet estimations in nature.

were injected in split mode at 250 °C. FAs were identified by comparing retention times of methyl esters standards (Supelco) and by reference to a well characterized fish oil (Salhi and Bessonart, 2013). FA data were expressed as the mass percentage of total FA ± sd.

2.6. Predator database and prey database

2.6.1. Predator database

Since over the reproductive period (December to March) *P. orbignyanus* migrates towards marine water for spawning, only the FA signature of flounders from April to November was included in the predator database. This period corresponds to the fattening stage prior to the fish breeding season out at sea.

2.6.2. Prey database

To capture the variability in the potential prey FA profiles, 150 fatty acid signatures were gathered belonging to 17 prey items. In the case of large prey (such as fish) some were analyzed as individual or small groups of fish. Small prey were usually grouped to be biochemically analyzed (at least 3 samples per prey item were analyzed).

2.7. Quantitative fatty acid statistical analysis method

The estimate of predator diet was obtained by considering a weighted combination of the fatty acid signatures of the prey and then determining the weighting coefficients that best explain the fatty acid signature of the predator. This was implemented by minimizing the statistical distance between the combination of fatty acid signatures and that of the predator.

Let y be a vector, whose elements y_j describe the proportion of each fatty acid j of the predator. Following Iverson et al. (2004), the model can be stated as estimating y as a weighted sum \hat{y} of the fatty acids of the prey,

$$\hat{y} = \sum_k p_k \hat{x}_k$$

where \hat{x}_k is a vector, whose elements \hat{x}_{kj} are the mean of each fatty acid j of the prey type k and p_k is a weighting coefficient that corresponds to the estimated proportion of the prey type k in the predator diet. The goal of the analysis is to choose the \hat{p}_k values such that the model estimation \hat{y} is as close as possible to the real profile y . Since y and \hat{y} are distributions over the fatty acids, the Kullback–Liebler (KL) distance is used to compare fatty acid profiles where,

$$KL = \sum_j (y_j - \hat{y}_j) \log \left(\frac{y_j}{\hat{y}_j} \right).$$

In addition, the p_k values are constrained to be positive and sum to 1. Therefore, the estimation can be formulated as an optimization problem with constraints,

$$\begin{aligned} \min \quad & KL = \sum_j (y_j - \hat{y}_j) \log \left(\frac{y_j}{\hat{y}_j} \right). \\ \text{subject to} \quad & \sum_k p_k = 1, \quad p_k \geq 0. \end{aligned}$$

The optimization was carried out in Matlab using its optimization toolbox. As in Iverson et al. (2004), no prior bias was assumed for any

prey, so the optimization was initialized with equal values for all p_k coefficients. To account for variations in the key signature of a prey type due to differences in the fatty acid profile of the individuals in the sample, a bootstrap procedure was carried out in which the optimization was repeated. In each iteration, for a total of 100 repetitions, the sample of each prey type was randomly selected with replacement from the database. This allowed the computation of standard deviation for the experiments.

2.8. Captive feeding trials, calibration coefficients (CC) and validation of the model

Additional methodological issues have to be taken into account to estimate the diet based on the described method. Due to the fact that the fatty acid profiles of the prey are not transferred exactly to the predator because of the effect of its lipid metabolism, calibration coefficients (CC) must be determined by feeding individuals in captivity with a known diet. Additionally, since not all fatty acids provide equal information about diet due to predator metabolism, subsets of FA considered to better reflect the diet were selected (instead of using all the identified fatty acids). Finally, the contribution from each prey in the diet must be adjusted to account for the differences in fat content of the different prey items.

2.8.1. Captive feeding trials

In order to determine the quantity of the FA signature of prey that resembles the FA deposition in *P. orbignyanus*, and to obtain calibration coefficients, a 136 day feeding trial with two groups of flounders fed with two types of prey, was designed. The duration of the experiment was set up to 20 weeks, based on studies reporting that after 2 to 12 weeks of being fed a diet, the fatty acid profile of the storage tissue of fish is stabilized (Budge et al., 2011; Copeman et al., 2013; Kirsch et al., 1998; Skonberg et al., 1994).

For this experiment, 23 *P. orbignyanus* were captured at Rocha lagoon. Six of them were used to obtain the initial FA profile of the feeding trials. The others were housed at the Experimental Station for Marine and Aquaculture Research where they were acclimated for three months until they were domesticated to be fed in captivity. The captive fish were separated into two groups, one group ($n = 9$, min. 482 g, max. 1777 g) was fed with headless and gutless *Odontesthes argentinensis*, and the other group ($n = 8$, min. 427 g, max. 1597 g), was fed with filets of *Brevoortia aurea*. The animals were fed daily at sunset to satiation.

To minimize the variation of the fatty acid profile of the items offered as prey during the feeding trial, all the fish used as food during the whole experiment were caught from the same batch, at the same time in the Rocha lagoon on April 2010 (*O. argentinensis* 53.5 ± 14.1 g and *B. aurea* 45.0 ± 9.9 g). Samples of twelve individuals of *B. aurea* and *O. argentinensis* were analyzed for FA to calculate the CC.

Formulated dry food was not used for these trials, because flounders of this species caught as adults in the wild do not accept artificial food once domesticated, but only dead prey.

2.8.2. Live biopsy technique

At weeks 5, 12 and 20 a live biopsy technique was applied to the flounders of the feeding trials. At first, only 3 individuals of each treatment were biopsied; at week 12, all individuals of each group were biopsied; and at week 20 all individuals were biopsied and 6 of them per feeding group were euthanized to obtain samples of liver tissue. The live biopsy allows sampling the same individual each time in order to see the temporal evolution in the FA profile. To prevent opportunistic infections, the day before the biopsy, the flounders were kept in oxitetracycline 0.02 g/l. After 5 min of benzocaine 0.001 g/l anesthetization, a cube of muscle with skin from the upper dorsal part of the fish body was taken (approximately 7 mm by side), followed by cauterization and propolis treatment of the area. The following seven

days, the flounders were treated with oxitetracycline 0.02 g/l. In the euthanized individuals, the liver was also sampled for FA analysis and a larger piece of muscle with skin was collected in order to determine if the smaller pieces taken in previous biopsies were representative of the FA profile.

2.9. Calibration coefficients (CC)

The CC for *P. orbignyanus* were calculated according to Iverson et al. (2004) by dividing FA levels of dorsal muscle with skin or liver tissue of flounders of the feeding trials, by FA levels of the prey item offered (*O. argentinensis* or *B. aurea*). Fig. 2 shows the experimental design of feeding trials and the number of sets of calibration coefficients calculated in each biopsy (at weeks 5, 12 and 20). All sets of CC were calculated as a 10% trimmed mean.

2.10. Validation of the QFASA model

To determine the optimum CC to be applied in the model, and also to validate the use of this approximation in our model fish, we ran the QFASA model using not only data of feeding prey offered during the feeding trials, but also data of all prey items sampled in the Rocha lagoon. Additionally, a crossvalidation between all FA subsets and both tissues sampled (muscle with skin and liver) with and without CC, was tested. The optimum CC and the subset of FA that best resembled the prey offered during feeding trials were evaluated.

2.11. Diet determination using QFASA

2.11.1. Qualitative analysis of diet items

Hierarchical cluster analysis was used in the prey database, prior to the application of QFASA to assess how well the FA profile separated potential prey. To minimize the noise around the diet estimates, species or group of species too close in the analysis were grouped. The distance among clusters was computed by an agglomerative method using average linkage between groups and KL distance measured using Matlab 7.0 software.

2.11.2. FA subset selection and model evaluation

Seven subsets of FA were selected to evaluate the performance of the model. The number of FA included in each subset varied from 36 to 10 FA, ranging from $98.7 \pm 1.3\%$ to $12.6 \pm 4.3\%$ of total FA (Table 1) and all subsets were normalized to 100% before each evaluation. The criteria utilized to select the FA included in each subset, were based on groups of FA selected according to their essentiality for a marine fish.

3. Results

3.1. Sample collection

Sample size and size of potential prey collected at Rocha lagoon are shown in Table 2. Lipid content and selected fatty acids from the FA profile of the predator and prey used to construct the prey-database, are presented in Table 3.

The five species of fish sampled included individuals of a wide range of size, from around 2.5 cm to 20 cm. Their lipid content (% WW) varied from 1.7 ± 0.4 for *Jenynsia multidentata* to 2.6 ± 0.8 for *Oligosarcus* sp. The other three species had a similar content of lipids (around 1.8% WW). 12 items of invertebrates were collected consisting of 10 single species, one group of Amphipoda and one group of Isopoda. Three groups can be distinguished regarding their lipid content: Amphipoda, *Heleobia australis* and *Erodona mactroides* had the lowest lipid level (around 0.4% WW), Isopoda and *Penaeus paulensis* had the highest (around 2.5% WW) and the rest were intermediate (from around 0.6 to 1.4% WW).

3.2. Feeding trial

During the feeding trial, flounders accepted in equal manner the food offered in both groups (data not shown). After 20 weeks of the feeding trial, total weight gained by the fish did not represent more than 10.0 or 14.0% of the initial weight (silverside and menhaden groups respectively). We assumed that the change in fatty acid profile of their muscles was mostly due to turnover of their FA, rather than the result of a dilution process (Jobling, 1993).

Although menhaden filets contained a higher level of lipids, no significant differences were found ($P > 0.05$) in the lipid content of muscle with skin between the flounders undergoing the different diets (Table 4). Samples of menhaden filets showed a high variation in their lipid (relative standard deviation = 46.8%).

To gain confidence on how representative the samples of muscle with skin were, different parts of this tissue of seven wild flatfish were sampled before the feeding trials. FA profiles obtained were similar, confirming that the smaller portion of biopsied tissue was representative of the FA profile of muscle with skin (data not shown).

The fatty acid profile of prey (silverside and menhaden) and flounders of the feeding trial at the beginning of the experiment (initial) and at weeks 5, 12 and 20 are presented in Fig. 3.

The characteristic FA profile of the captive flounders, changed over time as a result of the two different diets (silverside or menhaden) supplied (Fig. 3). For the initial biopsy, both groups of flatfish (fed with silverside and fed with menhaden) showed a similar FA profile, where saturated (SAFA) represented 53.7 and 55.1%, monounsaturated (MUFA) 35.3 and 32.1% and polyunsaturated (PUFA) 11.1 and 11.8% respectively, differing strongly from initial FA profile.

After 20 weeks, the FA profile of silverside and menhaden flatfish groups changed: SAFA represented 34.8 and 43.1%, MUFA 25.2 and 22.7% and PUFA 40.1 and 34.2%, respectively, resembling the supplied diet in each case. It could be noted that the major differences found in PUFA relate to n3—HUFA content, which was higher in silverside (24.9 and 11.0% in menhaden).

Silverside contained higher proportions of 18:1n – 9, 20:4n – 6, 20:5n – 3, 22:5n – 3 and 22:6n – 3 than menhaden, that was richer in SAFA and MUFA such as 14:0, 16:0, 16:1n – 7, 18:0 and 20:1. Relative amounts of 18:2n – 6 and 18:3n – 3 were similar in both prey. In general, FA profile of *P. orbignyanus* varied according to the FA profile of the prey supplied during the feeding trial. In the case of 14:0, 16:0, 16:1n – 7 and 18:0, higher in menhaden than in silverside, levels found in *P. orbignyanus* fed silverside reached higher levels on weeks 5 or 12 than in flounders fed menhaden; but at week 20 proportions were higher in *P. orbignyanus* fed menhaden. In spite of a higher level of 20:1 in silverside, at week 20, almost no difference was found in the proportion of this FA in flounders fed the different diets. Regarding 18:1n – 9, 20:5n – 3, 22:5n – 3 and 22:6n – 3, higher in silverside than in menhaden, levels in *P. orbignyanus* fed the different diets were similar up to week 20 when they became higher in flounders fed silverside, especially for PUFA which proportionally was more than 38% higher in these flounders compared to those fed menhaden. However, in the case of 20:4n – 6, although its proportion in prey was four times higher in silverside than in menhaden, relative amounts found in flounders at week 20 were similar regardless the prey fed.

4. Calibration coefficients (CC)

The CC obtained during feeding trials (5, 12 and 20 weeks) for silverside and menhaden are shown in Fig. 4.

Several CC, such as those obtained for 12:0, 16:4n – 1, 18:4n – 1, 20:1, 20:4n – 6, 22:1, 22:4n – 9, 22:4n – 6, 22:5n – 3 and 22:6n – 3, had still not stabilized by feeding week 20. Others, such as 16:1, 16:3n – 4, 17:1, 18:3n – 3, 18:4n – 3, 20:2n – 6, 20:3n – 9 and 20:3n – 6, were mainly constant after 5 weeks of feeding. In the group of flounders fed on menhaden, the highest CC were obtained for 16:4n – 1, 18:4n – 1, 20:1, 20:4n – 6, 22:1, 22:4n – 9, 22:4n – 6 and 22:6n – 3. Some of them (16:4n – 1, 18:4n – 1, 22:4n – 9) appeared in low proportion (generally at 0.5% of total FA in flounders and prey) and because of the high relative standard deviation in minor or trace

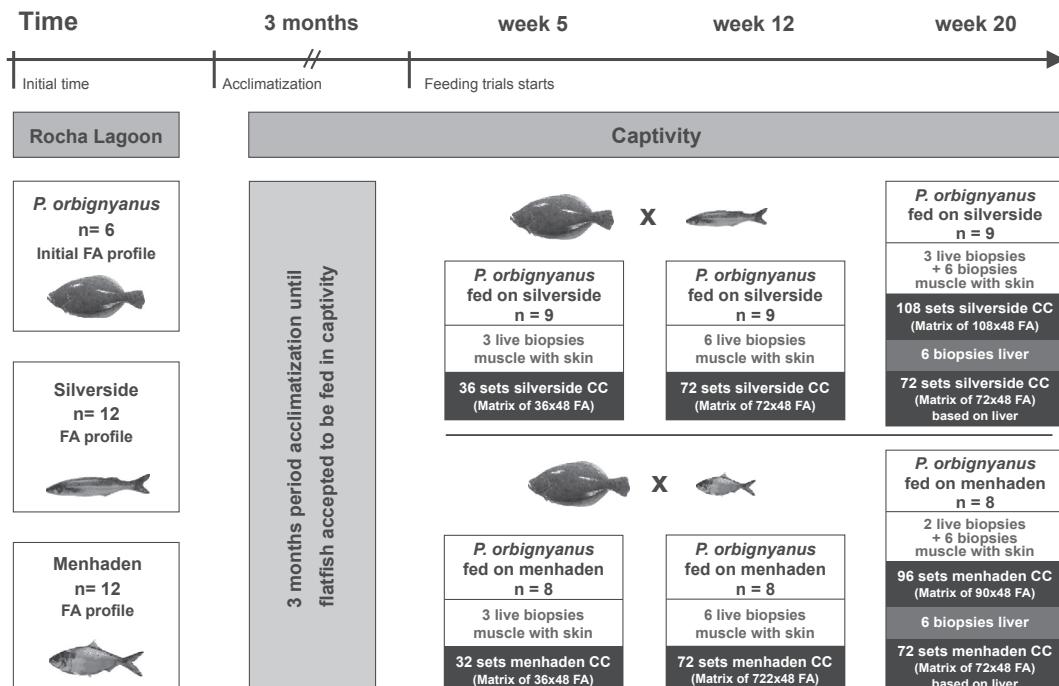


Fig. 2. Experimental design of feeding trials and calibration coefficients for both groups of *Paralichthys orbignyanus* fed with silverside and menhaden.

Table 1FA subsets tested for *Paralichthys orbignyanus* over the validation process.

| FA | 12:0 | 14:0 | 14:1 | 15:0 | 16:iso | 16:0 | 16:1n–7 | 16:1n–5 | 16:2 | 17:0 | 16:3n–4 | 17:1 | 16:4n–3 | 18:0 | 18:1n–9 | 18:1n–7 | 18:2n–6 | 18:3n–6 | 18:3n–3 |
|----------|------|------|------|------|--------|------|---------|---------|------|------|---------|------|---------|------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Subset A | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | |
| Subset B | | | | | | | | | X | X | X | | | | | X | X | X | |
| Subset C | | | | | | | | | X | X | X | | | | | X | X | X | |
| Subset D | | | | | | | | | X | X | X | | | | | X | X | X | |
| Subset E | X | | | | | X | X | | X | X | X | | X | X | X | X | X | X | |
| Subset F | | | | | | | | | | X | X | | | | | X | X | X | |
| Subset G | X | | | | | X | X | | | | | X | X | X | | | | | |
| Subset H | X | | | | | X | X | | | | | X | X | X | | | | | |

Table 1 (continued)

| FA | 18:4n–3 | 18:4n–1 | 20:0 | 20:1 | 20:2n–9 | 20:2n–6 | 20:3n–6 | 20:4n–6 | 20:3n–3 | 20:4n–3 | 20:5n–3 | 22:1 | 22:3n–6 | 22:4n–6 | 22:5n–6 | 22:5n–3 | 22:6n–3 | #of FA | % FA |
|----------|---------|---------|------|------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|-------------|
| Subset A | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | 36 | 97.8 ± 1.3 |
| Subset B | X | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | 21 | 34.0 ± 10.6 |
| Subset C | X | X | | X | X | X | X | | | | X | X | X | X | X | | | 16 | 17.93 ± 5.6 |
| Subset D | X | X | | X | | | | | | | X | | | | | | | 10 | 12.6 ± 4.3 |
| Subset E | X | X | | X | | | | | | | X | | | | | | | 16 | 71.0 ± 10.4 |
| Subset F | X | | | | X | X | X | X | X | X | | X | X | X | X | X | X | 17 | 32.1 ± 11.8 |
| Subset G | | | | | X | X | X | X | X | | | X | X | X | X | X | X | 17 | 82.7 ± 5.3 |
| Subset H | | | | | X | X | X | X | X | | | X | X | X | X | X | X | 16 | 80.8 ± 5.0 |

Table 2

Sample size and size of potential prey items sampled at Rocha lagoon. x = mean, sd = standard deviation. Min: minimum, Max: maximum.

| Items | Number of individuals | Number of samples analyzed for lipids and FA ^a | Length (x ± sd) or min–max (cm) | Weight (x ± sd) or min–max (g) |
|---------------------------------|-----------------------|---|---------------------------------|--------------------------------|
| Fishes | | | | |
| <i>Odontesthes bonaerensis</i> | 13 | 13 | 15.05 ± 2.47 | 24.63 ± 10.49 |
| <i>Micropogonias furnieri</i> | 12 | 6 | 3.90–19.30 | 0.60–64.00 |
| <i>Brevoortia aurea</i> | 14 | 14 | 5.10–20.40 | 10.50–20.40 |
| <i>Jenynsia multidentata</i> | 36 | 7 | 3.01 ± 0.42 | 0.30 ± 0.13 |
| <i>Oligosarcus</i> sp. | 3 | 3 | 6.50 ± 0.50 | 5.50 ± 0.70 |
| Invertebrates | | | | |
| <i>Callinectes sapidus</i> | 24 | 6 | 1.74 ± 0.43 | 0.43 ± 0.31 |
| <i>Chasmagnathus granulatus</i> | 51 | 17 | 2.51 ± 0.21 | 9.24 ± 1.97 |
| <i>Cryptopagrus angularis</i> | 48 | 18 | 1.99 ± 0.57 | 3.87 ± 2.47 |
| <i>Palaemonetes argentinus</i> | 18 | 12 | 2.17 ± 0.85 | 2.15 ± 0.99 |
| <i>Penaeus paulensis</i> | 25 | 5 | 10.80–18.00 | 7.30–31.00 |
| <i>Neomysis americana</i> | 400 | 7 | 1.35 ± 0.16 | 0.01 ± 0.00 |
| <i>Laeonereis acuta</i> | 258 | 5 | 3.29 ± 0.81 | 0.00 ± 0.00 |
| <i>Heteromastus similis</i> | 31 | 3 | – | – |
| Amphipoda | 585 | 8 | 0.60 ± 0.20 | 0.01 ± 0.00 |
| Isopoda | 63 | 7 | 0.99 ± 0.34 | 0.02 ± 0.01 |
| <i>Heleobia australis</i> | 263 | 8 | 5.90 ± 1.26 | 0.02 ± 0.01 |
| <i>Erodona mactroides</i> | 88 | 11 | 12.00 ± 3.70 | 0.50 ± 0.25 |

^a In cases where the number of individuals does not match the number of analyses, the latter were analyzed as a pooled sample for analytical purposes.

FA, those resulted in high CC. As this might have considerable effects on estimates, CC for these FA were removed from modeling subsets.

4.1. Validation of the model

Estimations of the diet of flounders fed with silverside and menhaden during the feeding trial at week 20 are shown in Table 5. This table represents the estimation made using muscle with skin and liver as predator storage tissue. Seven subsets of FA were proposed, and for each group the validation was checked using four sets of CC (silverside, menhaden, the mean CC between silverside and menhaden and without CC), 102 results of estimations were obtained (Table 5).

When considering the best tissue as the predator energy reservoir (PER), no statistical differences ($P < 0.05$) were found between muscle with skin and liver. This held true regardless of the FA subsets when CC applied corresponded with the diet offered.

When liver was used as PER, both groups showed the same trend (low percentages of estimation), in the case of applying silverside CC to estimate menhaden diet, or applying menhaden CC to estimate silverside diet (0.5 to 44%).

The silverside CC obtained resulted in the best predictors of the diet for both groups (fed silverside and menhaden) when muscle with skin was used as PER. However, when liver was used as PER, silverside CC was good at estimating the silverside diet, but did not work well at estimating the menhaden diet.

When the model was run with menhaden CC to predict the diet of flatfish fed menhaden, good estimations were obtained (54.6 ± 19.1% to 88.5 ± 13.2%, Table 5), but never as good as when using silverside CC (87.5 ± 10.7% to 98.7 ± 2.5%, Table 5).

Silverside CC when applied, for the estimation of the diet of flatfish fed silverside, explained more than 88% of the diet regardless the FA subset. Estimations obtained using menhaden CC always explained less of the diet than silverside CC.

When the average of the CC from menhaden and silverside was applied, both groups (muscle with skin and liver) showed a wide range of levels of diet estimation (from 23 to 80%), in most cases representing more than 40% of the correctly identified consumed prey.

Regarding the FA subsets, subset B was on average, always the best in all groups (except in the case of menhaden group without applying CC). Subsets F and G showed on average the worst results identifying consumed prey.

Given the previous results – of verification if the model consistently predicts what the flatfish have eaten – the silverside CC was the best (Table 5) with high percentages of success (averaging all FA subsets

93.0 ± 4.7%). For this reason, subsequent application of the QFASA model on the wild, it will utilize this CC obtained at week 20 of the feeding trial. The high percentage of success with silverside CC, in particular using subset B (98.7 ± 2.5%), together with the fact that the diet of *P. orbignyanus* in Laguna de Rocha is known through analysis of stomach contents (Norbis and Galli, 2004), encouraged us to apply this model during the period in which this flatfish is feeding in the same location of the previous study.

4.2. Diet determination using QFASA

As the clustering analysis did not show relevant similarity between the mean FA profile of the prey, it was not necessary to group any of the items to form the prey matrix. Thus, the 17 potential dietary items were reliably identified on the basis of their fatty acid patterns (Fig. 5) and the model was run with all these 17 groups.

The different items proposed as prey were grouped as expected with regard to their FA profile (Table 3). Crustaceans were grouped together, with the exception of *Neomysis americana* as this species showed a ratio of DHA/EPA > 1, different from that found in crustaceans as already reported by Richoux et al. (2005). Fish were also grouped together, with the minimum distance between the pair *Odontesthes argentinensis* and *Oligosarcus* sp. in this subcluster. *H. australis* and *L. acuta* were grouped together probably because of their similar feeding habits.

The relative contributions of each prey item in the diet of *P. orbignyanus*, tested over 4 subsets of FA proposed (A–D) are shown in Fig. 6. FA subsets E–G are not included since they did not improve results obtained with the previous subsets.

The main prey item seemed to be *O. argentinensis*, even when CC were not used. The use of CC (obtained from muscle with skin of *P. orbignyanus* fed on silverside) resulted in similar percentage of *O. argentinensis* eaten regardless of the FA subset used. The use of CC implied the exclusion of prey items, such as *J. multidentata*, *Micropogonias furnieri* and *Oligosarcus* sp., that otherwise appeared as prey items for *P. orbignyanus*. Using CC, a very small percentage of *N. americana*, *B. aurea* and *H. australis* appeared as prey items of *P. orbignyanus*.

5. Discussion

5.1. Meeting requirements to QFASA application

In this work we applied QFASA to determine the diet of a top predator in a coastal lagoon in a conservation area. Ecological and methodological reasons led us to conduct this study in this site. From the

Table 3

Main fatty acids composition (% of total FA) of the predator and the prey. Values are expressed as mean \pm standard deviation.

| | <i>Paralichthys orbignyanus</i> adults | <i>Odontesthes bonaerensis</i> | <i>Micropogonias furnieri</i> | <i>Brevortia aurea</i> | <i>Jenynsia multidentata</i> | <i>Oligosarcus</i> sp. | <i>Callinectes sapidus</i> | <i>Chasmagnathus granulatus</i> | <i>Cryptopagrus angulatus</i> |
|-----------------|--|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Lip % DW | 4.1 \pm 1.5 | 7.2 \pm 1.7 | 8.6 \pm 5.1 | 9.8 \pm 2.4 | 7.2 \pm 1.4 | 10.7 \pm 9.9 | 3.9 \pm 1.6 | 2.7 \pm 1.2 | 3.3 \pm 0.8 |
| Lip % WW | 0.8 \pm 0.3 | 1.8 \pm 0.3 | 1.8 \pm 1.1 | 2.1 \pm 1.2 | 1.7 \pm 0.4 | 2.6 \pm 0.8 | 0.9 \pm 0.5 | 0.6 \pm 0.3 | 0.8 \pm 0.3 |
| FA % area | | | | | | | | | |
| 14:0 | 2.3 \pm 0.9 | 3.5 \pm 1.7 | 1.7 \pm 0.8 | 8.6 \pm 1.9 | 3.0 \pm 0.9 | 2.7 \pm 0.2 | 1.8 \pm 1.0 | 1.8 \pm 0.6 | 1.8 \pm 0.3 |
| 16:0 | 22.7 \pm 4.1 | 23.5 \pm 3.2 | 21.4 \pm 2.8 | 26.1 \pm 5.5 | 27.1 \pm 3.5 | 29.4 \pm 1.6 | 15.0 \pm 2.2 | 17.1 \pm 3.3 | 19.1 \pm 1.8 |
| 16:2 | 1.0 \pm 0.2 | 0.6 \pm 0.2 | 1.0 \pm 0.4 | 1.7 \pm 0.4 | 0.6 \pm 0.3 | 0.7 \pm 0.3 | 1.1 \pm 0.6 | 0.4 \pm 0.4 | 0.2 \pm 0.1 |
| 18:0 | 7.4 \pm 1.3 | 6.2 \pm 2.1 | 11.3 \pm 2.2 | 6.2 \pm 2.3 | 11.6 \pm 1.7 | 5.8 \pm 0.7 | 7.7 \pm 1.1 | 6.7 \pm 1.4 | 6.5 \pm 1.0 |
| 18:1n-9 | 13.2 \pm 3.1 | 16.0 \pm 4.8 | 11.5 \pm 0.5 | 14.0 \pm 3.4 | 13.2 \pm 2.3 | 5.7 \pm 1.1 | 6.1 \pm 0.7 | 11.2 \pm 2.0 | 9.6 \pm 2.9 |
| 18:2n-6 | 1.6 \pm 0.6 | 1.2 \pm 0.7 | 1.2 \pm 0.3 | 1.3 \pm 0.3 | 3.7 \pm 1.4 | 0.8 \pm 0.4 | 3.6 \pm 2.9 | 5.1 \pm 1.4 | 2.6 \pm 1.0 |
| 18:3n-3 | 0.9 \pm 0.4 | 1.1 \pm 0.1 | 0.7 \pm 0.6 | 1.0 \pm 0.7 | 1.0 \pm 0.3 | 1.1 \pm 0.0 | 1.7 \pm 0.7 | 3.2 \pm 1.8 | 2.1 \pm 0.7 |
| 20:1 | 1.1 \pm 0.7 | 1.6 \pm 0.6 | 2.7 \pm 2.5 | 3.4 \pm 0.7 | 1.5 \pm 0.3 | 1.3 \pm 1.2 | 3.2 \pm 1.9 | 1.6 \pm 0.4 | 2.7 \pm 1.0 |
| 20:2n-6 | 0.2 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.1 | 0.6 \pm 0.2 | 0.3 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.2 | 1.2 \pm 0.4 | 0.8 \pm 0.2 | 0.9 \pm 0.2 |
| 20:4n-6 | 3.9 \pm 1.4 | 2.6 \pm 1.2 | 3.2 \pm 1.4 | 0.7 \pm 0.3 | 3.1 \pm 0.9 | 2.2 \pm 0.6 | 4.8 \pm 2.3 | 6.1 \pm 2.3 | 5.6 \pm 0.9 |
| 20:5n-3 | 3.5 \pm 1.3 | 4.9 \pm 2.0 | 4.8 \pm 1.3 | 4.1 \pm 2.7 | 0.9 \pm 0.4 | 6.4 \pm 1.5 | 17.1 \pm 2.1 | 11.8 \pm 4.1 | 13.3 \pm 3.1 |
| 22:1 | 0.4 \pm 0.2 | 0.6 \pm 0.4 | 1.0 \pm 0.3 | 0.7 \pm 0.1 | 0.7 \pm 0.2 | 0.4 \pm 0.1 | 1.0 \pm 1.0 | 0.6 \pm 0.4 | 0.8 \pm 0.3 |
| 22:5n-3 | 3.2 \pm 1.1 | 3.4 \pm 1.4 | 2.4 \pm 0.6 | 1.1 \pm 0.6 | 1.5 \pm 0.6 | 2.0 \pm 0.0 | 2.3 \pm 0.5 | 0.7 \pm 0.3 | 1.1 \pm 0.3 |
| 22:6n-3 | 17.4 \pm 7.3 | 13.1 \pm 3.5 | 12.9 \pm 8.8 | 5.9 \pm 3.3 | 3.9 \pm 1.7 | 22.0 \pm 5.7 | 7.4 \pm 4.1 | 5.0 \pm 2.4 | 5.3 \pm 1.1 |
| Saturated | 38.1 \pm 7.7 | 36.6 \pm 7.7 | 37.4 \pm 4.6 | 45.0 \pm 8.0 | 50.0 \pm 7.6 | 34.9 \pm 6.7 | 27.0 \pm 2.8 | 30.4 \pm 4.0 | 31.5 \pm 2.7 |
| Monounsaturated | 25.5 \pm 6.5 | 30.9 \pm 4.1 | 26.9 \pm 7.8 | 31.7 \pm 4.4 | 31.1 \pm 2.2 | 20.5 \pm 7.8 | 24.1 \pm 5.7 | 28.4 \pm 5.8 | 29.3 \pm 3.8 |
| Polyunsaturated | 35.6 \pm ### | 32.5 \pm 6.9 | 29.5 \pm 4.0 | 23.3 \pm 8.9 | 18.9 \pm 6.8 | 44.6 \pm 1.1 | 32.4 \pm 9.8 | 41.2 \pm 9.1 | 39.2 \pm 5.4 |
| n-9 | 15.4 \pm 3.4 | 18.2 \pm 4.9 | 14.7 \pm 3.2 | 18.0 \pm 3.9 | 16.0 \pm 2.6 | 9.1 \pm 2.0 | 8.5 \pm 3.5 | 13.6 \pm 2.4 | 12.8 \pm 3.4 |
| n-6 | 7.4 \pm 1.8 | 5.3 \pm 1.6 | 6.7 \pm 1.8 | 3.9 \pm 0.7 | 7.9 \pm 2.6 | 4.3 \pm 0.0 | 11.6 \pm 4.8 | 13.2 \pm 2.4 | 10.3 \pm 1.8 |
| n-3 | 26.9 \pm 8.7 | 24.3 \pm 5.3 | 22.5 \pm 8.6 | 14.9 \pm 7.7 | 9.0 \pm 3.1 | 35.1 \pm 3.9 | 30.9 \pm 4.7 | 24.2 \pm 7.1 | 25.3 \pm 4.4 |
| n-3 HUFA | 25.0 \pm 8.7 | 22.0 \pm 5.5 | 20.6 \pm 9.6 | 12.1 \pm 6.8 | 6.8 \pm 2.7 | 32.5 \pm 4.8 | 27.6 \pm 5.3 | 18.2 \pm 6.6 | 20.5 \pm 3.7 |
| | | | | | | | | | |
| | <i>Palaemonetes argentinus</i> | <i>Penaeus paulensis</i> | <i>Neomysis americana</i> | <i>Laeonereis acuta</i> | <i>Heteromastus similis</i> | Amphipoda | Isopoda | <i>Heleobia australis</i> | <i>Erodona mactroides</i> |
| Lip % DW | 5.4 \pm 0.6 | 7.1 \pm 2.2 | 9.2 \pm 0.4 | 6.9 \pm 1.8 | – | 3.8 \pm 0.9 | – | 0.9 \pm 0.5 | 0.7 \pm 0.0 |
| Lip % WW | 0.9 \pm 0.1 | 2.1 \pm 0.2 | 0.7 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.1 | 1.4 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.1 | 2.5 \pm 0.5 | 0.5 \pm 0.3 | 0.40 \pm 0.0 |
| FA % area | | | | | | | | | |
| 14:0 | 1.6 \pm 0.3 | 1.8 \pm 0.5 | 1.8 \pm 0.2 | 5.0 \pm 1.5 | 5.3 \pm 0.4 | 2.3 \pm 0.0 | 4.0 \pm 0.2 | 4.7 \pm 1.2 | 2.7 \pm 0.4 |
| 16:0 | 14.0 \pm 0.8 | 15.7 \pm 3.3 | 23.1 \pm 0.8 | 24.8 \pm 2.1 | 13.4 \pm 1.3 | 18.8 \pm 1.4 | 20.2 \pm 2.0 | 25.9 \pm 4.4 | 22.6 \pm 4.2 |
| 16:2 | 0.4 \pm 0.3 | 0.5 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.0 | 1.0 \pm 0.2 | 0.8 \pm 0.5 | 0.4 \pm 0.1 | 1.7 \pm 0.3 | 2.0 \pm 0.8 | 1.3 \pm 0.7 |
| 18:0 | 7.2 \pm 0.3 | 7.9 \pm 1.8 | 4.3 \pm 0.3 | 8.0 \pm 0.8 | 3.6 \pm 1.2 | 4.7 \pm 1.5 | 3.4 \pm 1.1 | 15.8 \pm 2.7 | 5.4 \pm 1.5 |
| 18:1n-9 | 12.5 \pm 0.8 | 7.8 \pm 1.1 | 7.7 \pm 0.5 | 4.0 \pm 0.4 | 3.0 \pm 0.3 | 11.8 \pm 0.3 | 8.5 \pm 0.5 | 2.3 \pm 0.9 | 2.9 \pm 1.0 |
| 18:2n-6 | 3.4 \pm 1.3 | 3.0 \pm 1.5 | 1.6 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.0 | 2.3 \pm 0.3 | 3.6 \pm 1.9 | 1.6 \pm 0.2 | 1.8 \pm 1.2 | 0.9 \pm 0.1 |
| 18:3n-3 | 1.8 \pm 0.2 | 1.3 \pm 0.6 | 1.2 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.0 | 1.7 \pm 0.5 | 3.5 \pm 1.3 | 1.1 \pm 0.2 | 1.8 \pm 0.6 | 2.3 \pm 0.4 |
| 20:1 | 1.6 \pm 0.3 | 4.0 \pm 1.0 | 1.5 \pm 0.1 | 5.0 \pm 0.7 | 4.9 \pm 0.0 | 2.5 \pm 0.3 | 1.2 \pm 0.0 | 4.9 \pm 1.6 | 4.7 \pm 1.5 |
| 20:2n-6 | 0.7 \pm 0.2 | 1.0 \pm 0.2 | 0.0 \pm 0.0 | 0.5 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | 0.4 \pm 0.2 | 0.9 \pm 0.0 |
| 20:4n-6 | 5.3 \pm 1.2 | 5.0 \pm 0.4 | 2.4 \pm 0.0 | 1.1 \pm 0.3 | 3.6 \pm 0.3 | 4.8 \pm 1.7 | 3.1 \pm 0.2 | 2.7 \pm 1.8 | 2.2 \pm 0.1 |
| 20:5n-3 | 17.1 \pm 0.4 | 14.2 \pm 3.4 | 16.5 \pm 1.3 | 5.7 \pm 2.1 | 8.5 \pm 0.2 | 12.8 \pm 0.5 | 14.2 \pm 1.1 | 2.5 \pm 2.0 | 7.2 \pm 3.7 |
| 22:1 | 0.4 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.3 | 0.5 \pm 0.0 | 1.5 \pm 0.6 | 1.1 \pm 0.3 | 0.9 \pm 0.2 | 0.8 \pm 0.5 | 4.0 \pm 1.8 | 1.1 \pm 0.3 |
| 22:5n-3 | 1.0 \pm 0.1 | 3.4 \pm 0.8 | 0.9 \pm 0.1 | 1.8 \pm 0.6 | 3.2 \pm 0.4 | 1.2 \pm 0.7 | 0.5 \pm 0.0 | 0.5 \pm 0.4 | 2.0 \pm 0.8 |
| 22:6n-3 | 7.8 \pm 0.4 | 5.6 \pm 1.4 | 21.1 \pm 2.0 | 0.9 \pm 0.5 | 1.6 \pm 0.2 | 4.2 \pm 2.0 | 1.9 \pm 0.1 | 2.7 \pm 1.5 | 7.0 \pm 3.3 |
| Saturated | 25.9 \pm 0.5 | 29.4 \pm 2.3 | 32.8 \pm 1.3 | 44.6 \pm 3.0 | 27.2 \pm 7.3 | 29.7 \pm 1.1 | 29.5 \pm 3.0 | 52.3 \pm 5.9 | 35.2 \pm 8.4 |
| Monoinsaturated | 29.2 \pm 1.0 | 27.2 \pm 2.9 | 16.1 \pm 1.1 | 33.5 \pm 1.4 | 32.4 \pm 3.1 | 30.3 \pm 1.2 | 36.3 \pm 2.5 | 25.6 \pm 0.9 | 25.7 \pm 1.8 |
| Polyunsaturated | 44.9 \pm 0.5 | 31.3 \pm 6.1 | 51.1 \pm 2.4 | 21.9 \pm 3.7 | 31.9 \pm 7.8 | 40.0 \pm 0.1 | 24.9 \pm ### | 22.2 \pm 5.0 | 39.1 \pm 7.9 |
| n-9 | 14.7 \pm 0.7 | 10.6 \pm 4.0 | 10.4 \pm 0.4 | 10.2 \pm 1.9 | 8.1 \pm 5.6 | 14.6 \pm 0.2 | 9.9 \pm 1.0 | 8.8 \pm 1.7 | 9.2 \pm 0.6 |
| n-6 | 10.2 \pm 0.3 | 11.8 \pm 1.5 | 5.4 \pm 0.1 | 3.0 \pm 0.4 | 10.4 \pm 2.2 | 10.5 \pm 0.2 | 6.2 \pm 1.1 | 5.7 \pm 3.6 | 6.2 \pm 0.7 |
| n-3 | 32.1 \pm 0.3 | 26.7 \pm 3.5 | 41.5 \pm 3.2 | 15.5 \pm 3.2 | 19.8 \pm 3.2 | 26.6 \pm 0.2 | 20.8 \pm 2.3 | 10.8 \pm 2.2 | 27.5 \pm 7.8 |
| n-3 HUFA | 26.8 \pm 0.2 | 24.0 \pm 4.8 | 40.1 \pm 3.2 | 8.7 \pm 3.1 | 13.9 \pm 0.9 | 19.8 \pm 1.6 | 17.3 \pm 1.3 | 6.5 \pm 2.0 | 17.4 \pm 7.7 |

ecological point of view, it is well known that accurate diet estimations of predators are a key factor to understanding the functioning of ecosystems, especially those belonging to protected areas where trophic relationships constitute a very powerful tool to develop effective management strategies (Sodhi and Ehrlich, 2010). From the methodological point of view, this well-studied semi-closed estuary (that remains disconnected from the sea for most of the year) constitutes

an ideal place to apply QFASA to determine the diet of fish in a semi-closed system, where all potential prey available to this predator are well known (Conde et al., 2002; Giménez et al., 2006; Norbis and Galli, 2004; Rodriguez-Graña et al., 2008).

In the present study, all the necessary requirements to successfully apply QFASA were considered namely: a comprehensive database matrix representing the FA signature of a representative sample of any possible prey for a given predator; a FA profile of the predator obtained from the tissues where energy is stored as lipids; an optimization model developed to minimize the distance between predators and prey FA profiles and calibration coefficients to account for the metabolism of the predator (Budge et al., 2006; Iverson et al., 2004).

Table 4

Percentage of lipids in the diets (silverside and menhaden) and in two groups of flounders in the feeding trial (WW = wet weight; mean \pm standard deviation).

| | Lipids % WW |
|---|-----------------|
| <i>Odontesthes argentinensis</i> | 2.9 \pm 0.7 |
| <i>Brevortia aurea</i> | 9.4 \pm 4.4 |
| <i>Paralichthys orbignyanus</i> fed with silverside | 0.74 \pm 0.30 |
| <i>Paralichthys orbignyanus</i> fed with menhaden | 0.80 \pm 0.32 |

5.2. Sample collection and matrix of FA construction

The matrix of the prey database used in this study, which included 17 items, largely reflects the prey available in the Rocha lagoon for the

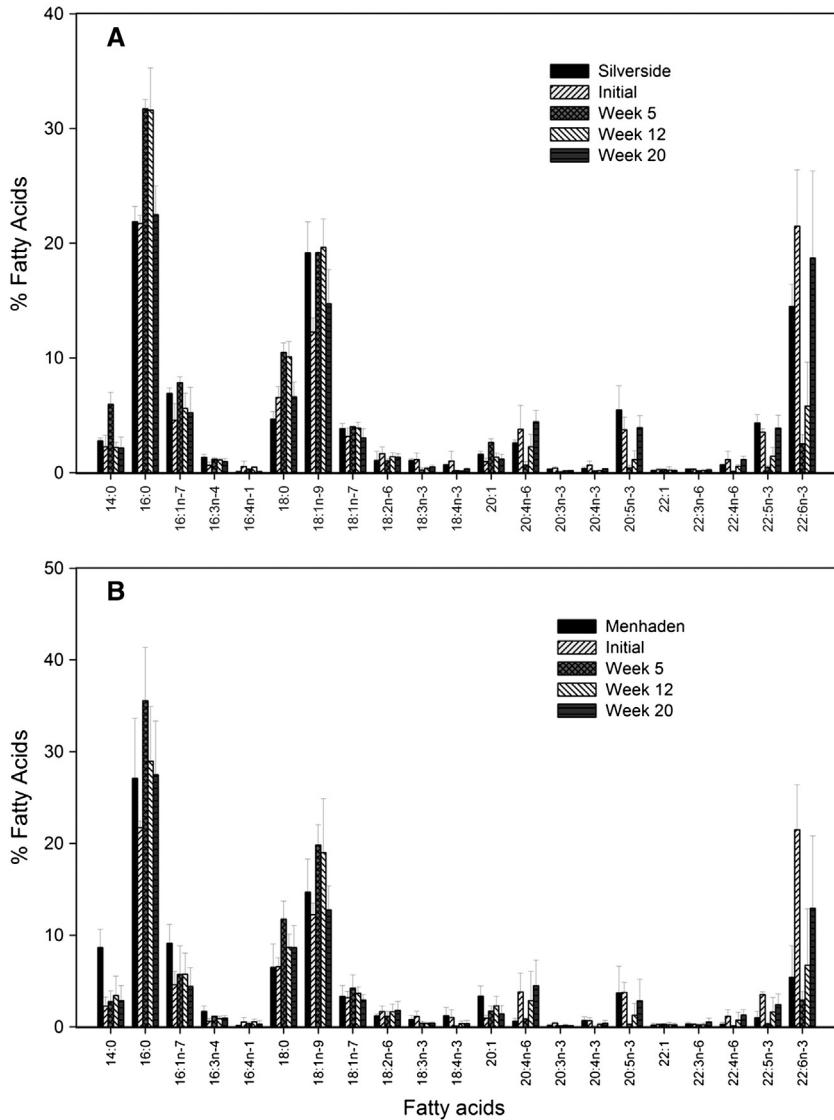


Fig. 3. Percentage of FA of prey and muscle with skin of *Paralichthys orbignyanus* fed with silverside (A) and menhaden (B) at weeks 0, 5, 12 and 20 of the captive feeding trial.

size range of the predator. Moreover, the proposed items (Table 2) covered all trophic interactions on the lagoon food web, between macro fauna and fish, excluding seabirds at the top of the web and plankton and macrophytes at the base (Rodríguez-Graña et al., 2008). The robustness of the matrix of prey was explored in order to ensure that the differences between the profiles of prey included in the database were big enough to effectively distinguish species based on their FA signature.

5.3. Energy reservoir identification

The next key factor to take into account in applying QFASA is the FA profile of the predator obtained from the main energy storage reservoir (Iverson, 2009). Fish can store their energy as lipids in different parts of their body, such as belly flaps, liver or lipid reservoirs between skin and muscle (sub-dermal lipids, usually sampled as muscle with skin) (Ackman, 1980; Brown, 1957). Since *P. orbignyanus* has no belly flaps and its fattening strategy was not clear, both muscle with skin and liver fatty acids were included to perform the validation of QFASA. The hepatosomatic index (HSI) variation in this study was not relevant (0.7–2.1) regardless of the fish size compared to other species that store lipids in the liver, such as *Gadus morhua* whose HSI varies between

2 and 9 (Yaragina and Marshall, 2000). On the other hand, when we considered the lipid content of muscle with skin, significant differences ($p < 0.05$) were found between pre spawning season ($0.79 \pm 0.28\%$ WW) and post spawning season ($0.47 \pm 0.13\%$ WW), pointing out that this flounder stores its lipid reserves in subdermal tissue. Furthermore, we found that both, data obtained from muscle and liver, gave good estimations of the real diet over the validation process, considering the results with and without calibration coefficients (98.7 and 77.3% in muscle and 99.0 and 88.2% in liver). However, considering the small monthly variation of the HSI during the pre-spawning season, we have a reasonable doubt about the role of the liver in *P. orbignyanus* as energy reservoir. In this case, the liver could be reflecting the short term metabolism, instead of the long term assimilated diet. Moreover, the fact that subdermal tissue of *P. orbignyanus* seems to be the metabolically active lipid reservoir, led us to decide to focus our analysis of estimations of diet in wild populations based on muscle with skin, although the results of the validation estimations in the liver were somewhat higher than in the muscle, depending on the selected subset of FA (Table 5). Since FA of polar lipids are best preserved than those of neutral lipids that better reflect dietary FA (Henderson and Tocher, 1987), the most accurate way to face this matter would be to use FA from muscle with skin neutral lipids to estimate the diet.

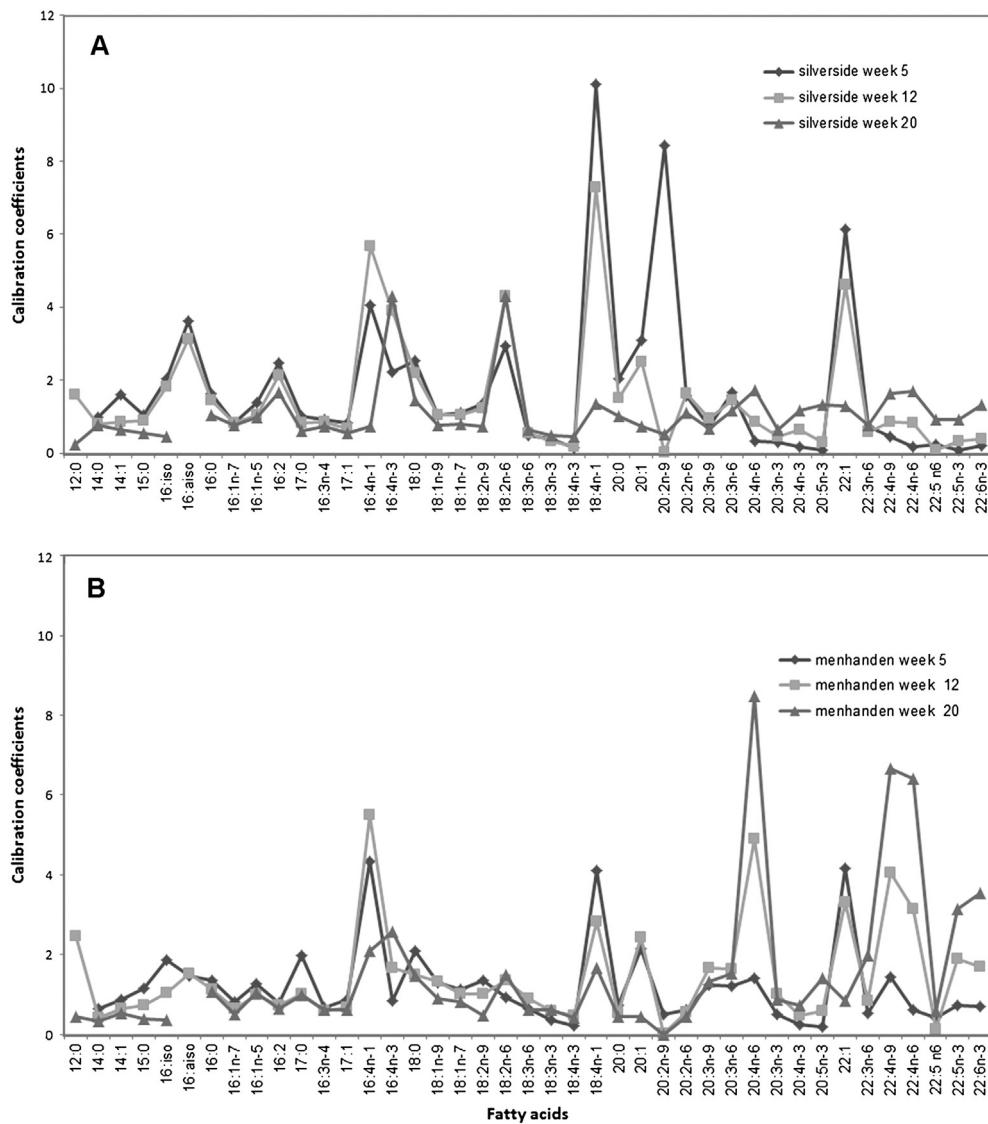


Fig. 4. Temporal evolution of calibration coefficients for *Paralichthys orbignyanus* obtained from dorsal muscle with skin at 5, 12 and 20 weeks of feeding on silverside (A) and menhaden (B).

Table 5

Estimation ($\% \pm \text{sd}$) of the real diet (silverside or menhaden) supplied in the feeding trial (week 20) over the validation process, using different predator tissues (muscle with skin or liver) and different FA subsets.

| Dorsal muscle with skin | FA subset A | FA subset B | FA subset C | FA subset D | FA subset E | FA subset F | FA subset G |
|---|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Flatfish fed with silverside (FA profile of week 20) | No CC | 49.0 \pm 5.4 | 77.3 \pm 12.3 | 29.9 \pm 13.8 | 0.0 \pm 0.0 | 34.4 \pm 5.9 | 56.1 \pm 7.1 |
| | Silverside CC | 94.9 \pm 2.9 | 98.7 \pm 2.5 | 94.7 \pm 5.8 | 87.5 \pm 10.7 | 97.8 \pm 2.2 | 88.3 \pm 3.7 |
| | Menhaden CC | 5.2 \pm 7.1 | 42.6 \pm 8.0 | 4.0 \pm 5.7 | 42.2 \pm 10.1 | 19.5 \pm 14.1 | 5.6 \pm 5.9 |
| | Mean CC | 45.6 \pm 5.6 | 80.8 \pm 6.5 | 57.7 \pm 5.1 | 74.2 \pm 11.5 | 84.4 \pm 4.5 | 46.5 \pm 5.6 |
| Flatfish fed with menhaden (FA profile of week 20) | No CC | 1.2 \pm 1.4 | — | — | 13.1 \pm 6.0 | 2.3 \pm 1.2 | 0.3 \pm 0.9 |
| | Silverside CC | 73.7 \pm 17.4 | 81.1 \pm 10.2 | 89.7 \pm 12.9 | 73.6 \pm 18.9 | 75.6 \pm 13.9 | 54.5 \pm 20.7 |
| | Menhaden CC | 64.5 \pm 15.5 | 80.5 \pm 4.6 | 88.5 \pm 13.2 | 73.8 \pm 19.3 | 78.8 \pm 13.5 | 57.7 \pm 19.7 |
| | Mean CC | 41.8 \pm 10.1 | 38.6 \pm 4.9 | 55.4 \pm 4.6 | 50.5 \pm 13.9 | 23.4 \pm 7.1 | 39.0 \pm 8.3 |
| Liver | FA subset A | FA subset F | FA subset C | FA subset D | FA subset E | FA subset G | FA subset H |
| Flatfish fed with silverside (FA profile of week 20) | No CC | 64.6 \pm 4.4 | 88.2 \pm 14.0 | 5.9 \pm 8.7 | 0.2 \pm 1.3 | 79.5 \pm 10.6 | 59.0 \pm 4.2 |
| | Silverside CC | 96.1 \pm 2.6 | 99.0 \pm 2.2 | 94.3 \pm 6.0 | 87.5 \pm 8.8 | 97.6 \pm 3.3 | 89.5 \pm 2.9 |
| | Menhaden CC | 2.4 \pm 4.9 | 30.3 \pm 12.1 | — | — | 44.8 \pm 11.1 | 0.5 \pm 1.8 |
| | Mean CC | 42.1 \pm 5.9 | 75.7 \pm 5.8 | 46.9 \pm 7.8 | 32.3 \pm 12.7 | 83.7 \pm 4.3 | 30.6 \pm 5.9 |
| Flatfish fed with menhaden (FA profile of week 20) | No CC | 20.0 \pm 2.2 | 10.0 \pm 2.1 | 48.4 \pm 10.0 | 70.6 \pm 20.5 | 25.4 \pm 5.9 | 17.4 \pm 2.6 |
| | Silverside CC | 4.4 \pm 1.9 | 9.2 \pm 1.9 | 21.7 \pm 6.6 | 17.4 \pm 18.4 | 10.7 \pm 4.0 | 0.4 \pm 0.5 |
| | Menhaden CC | 79.6 \pm 9.7 | 70.4 \pm 16.9 | 86.5 \pm 10.6 | 80.1 \pm 13.8 | 78.6 \pm 11.2 | 70.7 \pm 14.4 |
| | Mean CC | 38.9 \pm 5.7 | 31.6 \pm 10.6 | 60.3 \pm 6.6 | 54.1 \pm 19.0 | 30.2 \pm 3.8 | 28.3 \pm 4.9 |

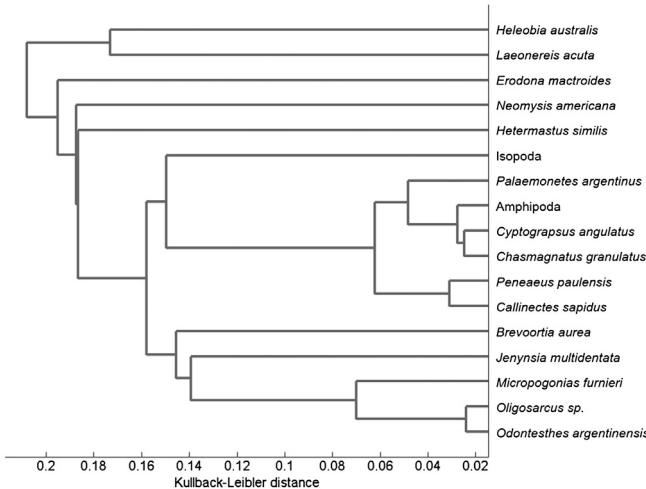


Fig. 5. Hierarchical cluster analysis based on FA profile over the 17 species recognized as potential prey for *Paralichthys orbignyanus* at Rocha lagoon.

5.4. Feeding trial and calibration coefficients

As fish used in the feeding trials were subadults and adults in prespawning season, variations or interferences due to the influence of physiological processes associated with starvation, spawning, maturity, migration, etc. on lipid metabolism (Sargent and Henderson, 1995) were avoided. Moreover, taking into account that this flatfish is a migratory species that spends about four months spawning in the sea and the

rest of the year feeding in the coastal lagoons, our dietary studies were focused on the period when these fish remain feeding in the lagoon.

There were many similar patterns between the CC obtained during the feeding trials with silverside and menhaden (Fig. 4), suggesting that the underlying metabolic processes were common among animals and diets. It could be noted that there is a generalized trend towards reaching a value of 1 in CC over time, although the CC of flounders fed silverside showed a strong tendency towards 1. Despite this fact, over the whole period of the feeding trials, the FA profile of flounders fed both menhaden and silverside did not clearly reach a constant value of CC 1 for all FAs.

Since many FAs did not stabilize within 20 weeks of feeding trial, this could be suggesting that QFASA is a model that fits better in those species consuming constant diets for long periods, rather than migratory species like *P. orbignyanus*.

Turchini et al. (2009) stated that high lipid diets may suppress de novo synthesis or increase β -oxidation of FAs in tissues of captive fish, and to account for predator metabolisms, feeding the experimental fish with a similar percentage of lipids of their metabolically active energy storage. In the present study, both items offered in the feeding trials had higher lipid content than the flatfish itself, especially menhaden (Table 4), even though the prey offered was, in the case of silverside the real prey in wild populations (Norbis and Galli, 2004), and in the case of menhaden, a potential prey. The elevated lipid content in menhaden and also its high intraspecific variation most likely makes this prey item not suitable for this type of feeding trial, although in both cases (silverside and menhaden) prey was collected as a single batch from the same site where the diet estimation was conducted. The slight adjustment of menhaden feeding trials would be related to the high variability of FA profiles shown by this species. Furthermore,

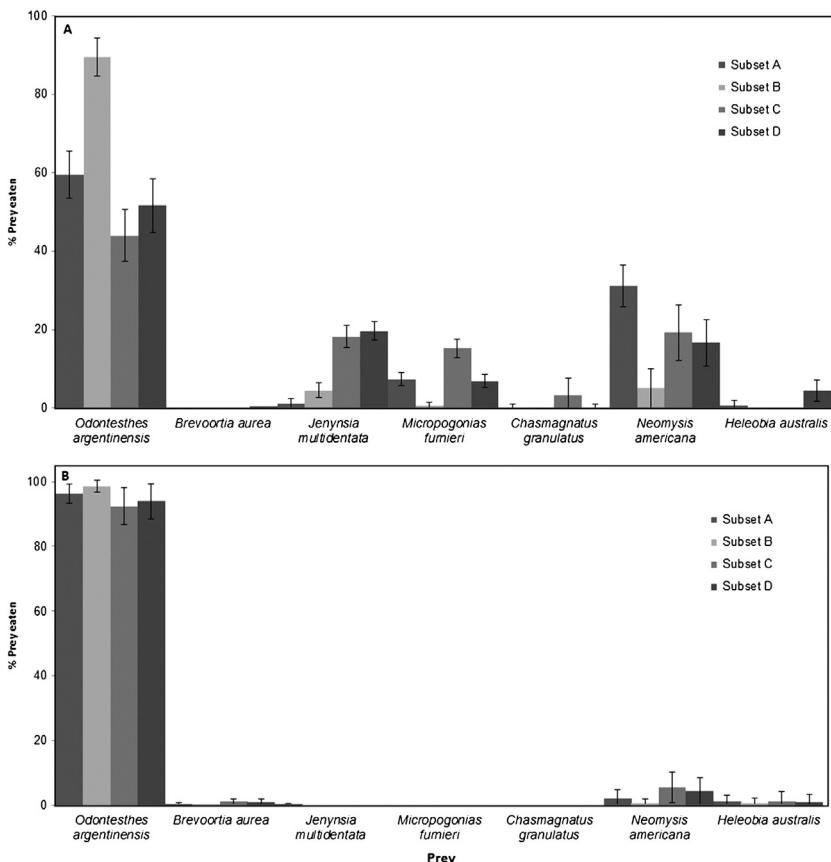


Fig. 6. QFASA diet estimations of *Paralichthys orbignyanus*, using the prey matrix of Rocha lagoon. Results are expressed as a percentage of eaten items, with four different subsets of FA (A–D). A. Results without calibration coefficients. B. Results with calibration coefficients obtained from flatfish muscle with skin at week 20 of feeding on silverside.

when menhaden CC were applied, the model correctly identified $80.5 \pm 4.6\%$ over the validation process, conversely, with results obtained with silverside feeding trials, without CC there was only a small resemblance of menhaden in real diet estimation, suggesting again that this species is not suitable for this kind of experiment.

In accord with previous studies (Budge et al., 2012; Rosen and Tollit, 2012), overestimating the presence of the item used as prey for CC calculations was also observed. Without questioning the necessity of using CC to compensate for lipid metabolism of the predator, it is important to highlight that the incorrect construction or improper use of CC can lead to poorer estimations. One way to attenuate the bias produced by the application of CC in the diet estimation, could be the application of CC on the prey FA profile, instead of on the predator one. From the practical point of view, this implies the development of CC for each potential prey and their application for the correction of each prey FA profile prior to running QFASA.

5.5. Subsets of FA performed in the model

The accuracy of the diet estimation is highly influenced by the FA subset selected to run QFASA, hence special attention should be paid in this regard (Budge et al., 2006). The construction of FA subsets includes endogenous FA, which could be present by de novo biosynthesis and dietary or exogenous FA, which content is mostly affected by dietary FA (Dalsgaard et al., 2003). The latter ones are the most informative about diet consumed, and hence the candidates to be included beforehand in the design of the FA subsets. Dietary fatty acid (DFA) are those that better resemble diet because they are not synthesized de novo by vertebrates and are those belonging to n – 3 and n – 6 series. Particularly, docosahexaenoic acid (22:6n – 3, DHA), eicosapentaenoic acid (20:5n – 3, EPA) (Cowey, 1988) and arachidonic acid (20:4n – 6, AA) (Bessonart et al., 1999), all constitute essential FA (EFA) for marine fish, because they lack the ability to elongate and/or to desaturate their shorter chain precursors: linoleic (18:2n – 6) and linolenic (18:3n – 3) acids, which several freshwater fish can do (Sargent et al., 2002). Selecting the FA subsets to run QFASA, the best option is to include the dietary FA, despite the higher percentage of all FA are the endogenous. QFASA model takes into account the relative amount of FA and for this reason it was designed to choose a distance as KL, which weighted rare or minor FA. Recently, Budge et al. (2012) observed that working with controlled feeding trials with fish (*Salmo salar*), the subsets which best resemble diets, were those which incorporate the dietary FA combined with other endogenous FA (such as 16:0, 16:1n – 7, 18:1n – 9, 18:0, etc.) which increase from approximately 39% to 90% of total FA. Thus, these authors proposed that a good strategy to establish the best subset would be to incorporate FA according to their concentration. Taking into account these observations, in this work the subsets tested contained different combinations of these FA comprising from 12.6 to 97.8% of total FA. However, the one which best resembled the diet in the feeding trials was subset B, which comprised only $34.0 \pm 10.6\%$ of total FA and included almost exclusively DFA.

During the comparison of performance of subset B (that includes only DFA) with subset A (which includes almost all but the trace FA), we noted that subset B showed a better resemblance to the diet. This was in accord with our expectations when we removed all non-dietary FA from subset A to create subset B (Table 1). Due to EFA could be involved in the selective retention processes associated with its essentiality (Henderson and Tocher, 1987), in subsets C and D different EFAs were removed in order to improve the resemblance of the diet to the subset. However no subset showed better performance than B, indicating that in this case the essential features of the FA did not affect its incorporation in reservoir tissues. Therefore the inclusion of the EFA into the FA subsets can improve the diet estimation, but according to other authors we cannot assume this to be always true (Budge et al., 2012). Moreover, even the inclusion of major FA in the subsets did not

improve our estimations. Subset selection seems to be a promising area for research, where physiological and maybe environmental considerations should be included in the design of the right subset selection for diet estimation of a given fish.

5.6. Diet determination using QFASA

Paralichthyidae flatfishes are one of the most studied flatfish groups in the world, due to their large size, they are the target of very important fisheries and aquaculture developments worldwide (Howell and Yamashita, 2005). Flatfish usually present two major feeding strategies: predators in benthic communities or piscivores.

Within the Paralichthyidae family there are species belonging to both groups (Link et al., 2005). Among piscivores, some species of the genus *Paralichthys* are proposed to be apex predators (Lee et al., 2010) and within the benthic predator group, several species of this family play an important role in energy conversion from macrobenthic fauna to superior levels, mainly feeding on polychaetes and small benthic crustaceans (Link et al., 2005).

In the case of *P. orbignyanus* previous studies on feeding habits of the species based on stomach content, reported that adult fish fed on both fish (Norbis and Galli, 2004) and benthic crustaceans (Carnikián, 2006), depending on the area and prey availability. It is known that some flatfishes can feed on small prey when the abundance of this kind of prey increases (Link et al., 2005).

Traditionally, studies on feeding habits of fish are based on qualitative and quantitative analysis of stomach content. These methods usually reflect the last food intake, several times inferring the diet from the identification of parts of hard tissues or remainders of skeletons and the occurrence of empty stomachs is common (Hyslop, 1980; Rindfort and Lewy, 2004). Alternatively the robustness of QFASA is associated with its capacity to detect small prey even reflecting the food intake from the previous weeks. According to that, determining a diet applying QFASA we found a greater number of prey than previous studies based on stomach content analysis (Carnikián, 2006; Norbis and Galli, 2004). The main difference was given by the presence in the diet of two groups of invertebrates (gastropoda and mysidacea).

According to Norbis and Galli (2004) the diet estimation by stomach content shows that *P. orbignyanus* feeds exclusively on fish (88% silverside, and 12% other fish) in the Rocha Lagoon. Using QFASA with CC we found that fish constitute around 97% of *P. orbignyanus* diet but when the model was applied without CC, fish presence in the diet varies from 68 to 95% depending on the FA subset. Interestingly, without calibration coefficients those prey hard to identify with the classic method increased both in number and amount, opening an interesting discussion about the suitability of the CC utilization, as other authors mentioned (Budge et al., 2012).

Considering the exclusion of CC when running QFASA to estimate the diet of *P. orbignyanus* and choosing subset B as the best subset, it could be observed that during the study period when this species entered the estuaries to fatten, particularly in Rocha lagoon, this flounder fed mainly on *O. argentinensis* with a minor percentage of other fish and crustacean (*N. americana*, at $5.1 \pm 2.4\%$). This result was largely in agreement with the feeding habits previously reported for this species in the same study area (Norbis and Galli, 2004). Although minor differences could be highlighted, especially those referred to as soft-bodied prey (*N. americana*), that enhances the robustness of this type of model in detecting those species hard to identify with conventional methodologies due to its elevated rates of digestion. However, these results raise the additional question if this tiny crustacean (*N. americana*) could be a real prey for this large sit-and-wait top predator. The possible explanation concerns the feeding strategy of the main prey of *P. orbignyanus*, the silverside (*O. argentinensis*), that it is known to feed on *N. americana* when they are in the filter feeding stage (Sagretti and Bistoni, 2001), in which case the model could be reflecting the stomach content of the silverside.

6. Conclusions

QFASA was initially developed for upper trophic level endothermic vertebrates, and to the best of our knowledge this is the first study to quantify the diet of lower vertebrate species (*P. orbignyanus*). This flatfish was selected for having well characterized feeding habits from previous researches in the study area. Application of QFASA without calibration coefficients resulted in a good approximation of the natural diet of this fish, in line with results from previous studies, but detecting soft-bodied prey. It would be interesting to focus future work in the development of prey calibration coefficients for a given predator instead of predator CC for any potential prey.

Acknowledgments

We would like to thank the Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA) for providing the facilities during this work. We are grateful to the people in charge of taking care of the fish in the Estación Experimental de Cultivos Marinos y Acuicultura. We also thank the anonymous reviewers for their supportive comments that helped us in the production of this manuscript. We are grateful as well to the fishermen who work at Rocha lagoon for their willingness and the time they took to work with us, especially Estela. This work was conducted in accordance with current regulations of the Institutional Animal Care of Uruguayan laws. We also want to thank the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) for partially funding the development of this research. [SS]

References

- Ackman, R.G., 1980. Fish lipids. Part 1. In: Connell, J.J. (Ed.), Advances in Fish Science and Technology. Fishing News Books Ltd, Farnham, UK, pp. 86–103.
- Aubriot, L., Conde, D., Bonilla, S., Hein, V., Britos, A., 2005. Vulnerabilidad de una laguna costera en una Reserva de Biosfera: indicios recientes de eutrofización. In: Vila, I., Pizarro, J. (Eds.), Taller Internacional de Eutrofización de Lagos y Embalses. CYTED XVIIIB, Patagonia Impresores Chile, pp. 65–85.
- Bergman, M.J., Van der Veer, H.W., Zijlstra, J.J., 1988. Plaice nurseries: effect on recruitment. *Fish. Biol.* 33, 201–218.
- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Herández-Cruz, C.M., González, M.M., 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.
- Bowen, W.D., 1997. Role of marine mammals in aquatic ecosystems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 158, 267–274.
- Bowen, W.D., 2000. Reconstruction of pinniped diets: accounting for complete digestion of otoliths and cephalopod beaks. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 898–905.
- Brown, M., 1957. The Physiology of Fishes Vol. I. Academic Press.
- Budge, S.M., Penney, S.N., Lall, S.P., 2011. Response of tissue lipids to diet variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*): implications for estimating diets with fatty acid analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 409, 267–274.
- Budge, S.M., Penney, S.N., Lall, S.P., 2012. Estimating diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using fatty acid signature analyses; validation with controlled feeding studies. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 69, 1033–1046.
- Budge, S.M., Iverson, S.J., Koopman, H.N., 2006. Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: a primer on analysis and interpretation. *Mar. Mamm. Sci.* 22, 759–801.
- Carnikián, A., 2006. Hábito alimenticio del lenguado *Paralichthys orbignyanus* en la región estuarial del Arroyo Pando Thesis degree Universidad de la República, Uruguay.
- Christie, G.W., 1982. Lipid Analysis. Pergamon Press.
- Colby, R.H., Mattacks, C.A., Pond, C.M., 1993. The gross anatomy, cellular structure, and fatty acid composition of adipose tissue in captive polar bears (*Ursus maritimus*). *Zoo Biol.* 12, 267–275.
- Connan, M., Cherel, Y., Mabille, G., Mayzaud, P., 2007. Trophic relationships of white-chinned petrels from Crozet Islands: combined stomach oil and conventional dietary analyses. *Mar. Biol.* 152, 95–107.
- Conde, D., Aubriot, L., Sommaruga, R., 2000. Changes in UV penetration associated with marine intrusions and freshwater discharge in a shallow coastal lagoon of the southern Atlantic Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 207, 19–31.
- Conde, D., Aubriot, L., Bonilla, S., Sommaruga, R., 2002. Marine intrusions in a coastal lagoon enhance the negative effect of solar UV radiation on phytoplankton photosynthetic rates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 240, 57–70.
- Copeman, L.A., Laurel, B.J., Parrish, C.C., 2013. Effect of temperature and tissue type on fatty acid signatures of two species of North Pacific juvenile gadids: a laboratory feeding study. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 448, 188–196.
- Cowey, C.B., 1988. The nutrition of fish: the developing scene. *Nutr. Res. Rev.* 1, 255–288.
- Dalsgaard, J., St John, M., Kattner, G., Müller-Navarra, D.C., Hagen, W., 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv. Mar. Biol.* 46, 225–340.
- Day, J.H., Blaber, S.J., Wallace, J.H., 1981. Estuarine fishes. In: Day, J.H. (Ed.), Estuarine Ecology with Particular Reference to Southern Africa. Balkema, Cape Town, pp. 197–221.
- Díaz de Astarloa, J.M., 2002. A review of the flatfish fisheries of the South Atlantic Ocean. *Rev. Biol. Mar.* 37, 113–125.
- Díaz de Astarloa, J.M., Munroe, T.A., 1998. Systematics and ecology of commercially important species of Paralichthyid flounders (*Paralichthys*: Paralichthyidae: Pleuronectiformes) co-occurring in Argentinean–Uruguayan waters: an overview. *J. Sea Res.* 39, 1–9.
- Elliott, M., Hemingway, K.L., 2002. Fishes in estuaries. Blackwell Science, p. 636.
- Elsond, T.S., 2010. Unraveling diet and feeding histories of fish using fatty acids as natural tracers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 386, 61–68.
- Fabré, N.N., Díaz de Astarloa, J.M., 1996. Pleuronectiformes de importancia comercial del Atlántico sudoccidental, entre los 34° 30' y 55° S. Distribución y consideraciones sobre su pesca. *Rev. Invest. Pesq.* 10, 45–55.
- Falk-Petersen, S., Dahl, T., Scott, C., Sargent, J., Gulliksen, B., Kwasniewski, S., Hop, H., Millar, R., 2002. Lipid biomarkers and trophic linkages between ctenophores and copepods in Svalbard waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 227, 187–194.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H., 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Giménez, L., Dimitriadis, C., Carranza, A., Borthagaray, A., Rodríguez, M., 2006. Unravelling the complex structure of a benthic sandflat. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 68, 462–472.
- Henderson, J., Tocher, D., 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid Res.* 26, 281–347.
- Howell, B.R., Yamashita, Y., 2005. Aquaculture and stock enhancement. In: Gibson, R.N. (Ed.), Flatfishes: Biology and Exploitation. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 347–372.
- Hyslop, E.J., 1980. Stomach contents: a review of methods and their application. *J. Fish Biol.* 17, 411–429.
- Iverson, S.J., Springer, A.M., Kitaysky, A.S., 2007. Seabirds as indicators of food web structure and ecosystem variability: qualitative and quantitative diet analysis using fatty acids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 352, 235–244.
- Iverson, S.J., 2009. Tracing aquatic food webs using fatty acids: from qualitative indicators to quantitative determination. In: Arts, M.T., Brett, M.T., Kainz, M.J. (Eds.), Lipids in Aquatic Ecosystems. Springer, New York, pp. 281–307.
- Iverson, S.J., Field, C., Bowen, W.D., Blanchard, W., 2004. Quantitative fatty acid signature analysis: a new method of estimating predator diets. *Ecol. Monogr.* 74, 211–235.
- Jobling, M., 1993. Bioenergetics: feed intake and energy partitioning. In: Rankin, J.C., Jensen, F.B. (Eds.), Fish Ecophysiology. Chapman & Hall, pp. 1–44.
- John, M., Lund, T., 1996. Lipid biomarkers: linking the utilization of frontal plankton biomass to enhanced condition of juvenile North sea cod. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131, 75–85.
- Kanazawa, A., Teshima, S.I., Ono, K., 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.* 63, 295–297.
- King, M., King, M., King, M., 1995. Fisheries Biology, Assessment and Management. Fishing New Books, Oxford.
- Kirsch, P.E., Iverson, S.J., Bowen, W.D., Kerr, S.R., Ackman, R.G., 1998. Dietary effects on the fatty acid signature of whole Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 1378–1386.
- Koutsikopoulos, C., Lacroix, N., 1992. Distribution and abundance of sole (*Solea solea* (L.)) eggs and larvae in the Bay of Biscay between 1986 and 1989. *Neth. J. Sea Res.* 29, 81–91.
- Lee, S.I., Aydin, K.Y., Spencer, P.D., Wilderburger, T.K., Zhang, C.I., 2010. The role of flatfishes in the organization and structure of the eastern Bering Sea ecosystem. *Fish. Sci.* 76, 411–434.
- Leveillé, J.C., Amblard, C.A., Bourdier, G., 1997. Fatty acids as specific algal markers in a natural lacustrine phytoplankton. *J. Plankton Res.* 19, 469–490.
- Link, J.S., Fogarty, M.J., Langton, R.W., 2005. The trophic ecology of flatfishes. In: Gibson, R.N. (Ed.), Flatfishes: Biology and Exploitation. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 185–212.
- López Cazorla, A., 2005. On the age and growth of flounder *Paralichthys orbignyanus* (Jenyns, 1842) in Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Hydrobiologia* 537, 81–87.
- López Cazorla, A., 1987. Contribución al conocimiento de la ictiofauna marina del área de Bahía Blanca PhD dissertation University of La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Mansour, M.P., Vickerman, J.K., Holdsworth, D.G., Jackson, A.E., Blackburn, S.I., 1999. Very-long-chain (C_{28}) highly unsaturated fatty acids in marine dinoflagellates. *Phytochemistry* 50, 541–548.
- Mianzan, H., Lasta, C.A., Acha, E.M., Guerrero, R.A., Macchi, G., Bremec, C., 2001. The Rio de la Plata estuary, Argentina–Uruguay. In: Seeliger, U., de Lacerda, L.D., Kjerfve, B. (Eds.), Ecological Studies: Coastal Marine Ecosystems of Latin America 144. Springer, pp. 185–204.
- Munroe, A., 2005. Atlantic flatfish fisheries. In: Gibson, R.N. (Ed.), Flatfishes: Biology and Exploitation Fish and Aquatic Resources Series vol. 9. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 292–318.
- Norbis, W., Galli, O., 2004. Hábitos de alimentación del lenguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes 1842) en una laguna costera somera del Atlántico Sur: Rocha, Uruguay. *Cienc. Mar.* 30, 619–626.
- Nordstrom, C.A., Wilson, L.J., Iverson, S.J., Tollitt, D.T., 2008. Evaluating quantitative fatty acids signature analysis (QFASA) using harbor seals *Phoca vitulina richardsi* in captive feeding studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 360, 245–263.
- Pimm, S.L., Lawton, J.H., Cohen, J.E., 1991. Food web patterns and their consequences. *Nature* 350, 669–674.
- Racicot, T., Groscolas, R., Cherel, Y., 1998. Fatty acid evidence for the importance of myctophid fishes in the diet of king penguins, *Aptenodytes patagonicus*. *Mar. Biol.* 132, 523–533.
- Richoux, N.B., Deibel, D., Thompson, R.J., Parrish, G.G., 2005. Seasonal and developmental variation in the fatty acid composition of *Mysis mixta* (Mysidacea) and *Acanthostepheia malmgreni* (Amphipoda) from the hyperbenthos of a cold-ocean environment (Conception Bay, Newfoundland). *J. Plankton Res.* 37, 719–733.

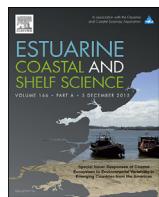
- Rindfort, A., Lewy, P., 2004. Bias in estimating food consumption of fish by stomach-content analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 61, 2487–2498.
- Rivera Prisco, A.R., García de la Rosa, S.B., Díaz de Aztarloa, J.M., 2001. Feeding ecology of flatfish juveniles (Pleuronectiformes) in Mar Chiquita coastal lagoon (Buenos Aires, Argentina). *Estuar. Coasts* 24, 917–925.
- Robaldo, R., 2003. Estudo comparativo da reprodução do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes 1839) no ambiente e em catálogo PhD dissertation Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Brasil.
- Rodríguez-Graña, L., Calliari, D., Conde, D., Sellanes, J., Urrutia, R., 2008. Food web of a SW Atlantic shallow coastal lagoon: spatial environmental variability does not impose substantial changes in the trophic structure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 362, 69–83.
- Rosen, D.A., Tollit, D.J., 2012. Effects of phylogeny and prey type on fatty acid calibration coefficient in three pinniped species: implications for the QFASA dietary quantification technique. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 467, 263–276.
- Rouvinen, K., Kiiskinen, T., 1989. Influence of dietary fat source on the body fat composition of mink (*Mustela vison*) and blue fox (*Alopex lagopus*). *Acta Agric. Scand.* 39, 279–288.
- Sagretti, L., Bistoni, M., 2001. Feeding of *Odontesthes bonaerensis* (Cuvier & Valenciennes 1835) (Atheriniformes, Atherinidae) in the saline lake of Mar Chiquita (Cordoba, Argentina). *Gayana* 65, 37–42.
- Salhi, M., Bessonart, M., 2013. Growth, survival and fatty acid composition of *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824) larvae fed on artificial diet alone or in combination with *Artemia nauplii*. *Aquacult. Res.* 44, 41–79.
- Sargent, J.R., Henderson, R.J., 1995. Marine (n-3) polyunsaturated fatty acids. In: Hamilton, R.J. (Ed.), *Developments in oils and fats*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 32–65.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids, In: Halver, J.E. (Ed.), *Fish nutrition*, 3rd edition Academic Press, Inc., San Diego, CA, pp. 182–246.
- Schoener, T.W., 1971. Theory of feeding strategies. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 2, 369–404.
- Shearer, K.D., 1994. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture* 119, 63–88.
- Sih, A., Englund, G., Wooster, D., 1998. Emergent impacts of multiple predators on prey. *Trends Ecol. Evol.* 13, 350–355.
- Skonberg, D.I., Rasco, B.A., Dong, F.M., 1994. Fatty acid composition of salmonid muscle changes in response to high oleic acid diet. *J. Nutr.* 124, 1628–1638.
- Sodhi, N.S., Ehrlich, P.R., 2010. *Conservation Biology for All*. University Press, Oxford.
- Sommaruga, R., Conde, D., 1990. Distribución de la materia orgánica en los sedimentos recientes de la laguna de Rocha (Uruguay). *Atlantica* 12, 35–44.
- Stowasser, G., Pond, D.W., Collins, M.A., 2009. Using fatty acid analysis to elucidate the feeding habits of Southern Ocean mesopelagic fish. *Mar. Biol.* 156, 2289–2302.
- Thiemann, G.W., Iverson, S.J., Stirling, I., 2008. Polar bear diets and arctic marine food webs: insights from fatty acids analysis. *Ecol. Monogr.* 78, 591–613.
- Tucker, S., Bowen, W.D., Iverson, S.J., Blanchard, W., Stenson, G.B., 2009. Sources of variation in diets of harp and hooded seals estimated from quantitative fatty acid signature analysis (QFASA). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 384, 287–302.
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Ng, W.K., 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquacult.* 1, 10–57.
- Wang, S.W., Hollmén, T.E., Iverson, S.J., 2010. Validating quantitative fatty acids signature analysis to estimate diets of spectacled and Stellers eiders (*Somateria fischeri* and *Polyictica stellaris*). *J. Comp. Physiol. B* 180, 125–139.
- Whitfield, A.K., 1998. Biology and ecology of fishes in Southern African estuaries. *Ichthyol. Monogr.* Smith Inst. Ichthyol. 2.
- Williams, C.T., Iverson, S.J., Buck, C.L., 2009. The effects of diet and caloric restriction on adipose tissue fatty acid signatures of tufted puffin (*Fratercula cirrhata*) nestlings. *J. Comp. Physiol. B* 179, 711–720.
- Yaragina, N.A., Marshall, C.T., 2000. Trophic influences on interannual and seasonal variation in the liver condition index of Northeast Arctic cod (*Gadus morhua*). *ICES J. Mar. Sci.* 57, 42–55.
- Young, J.W., Guest, M.A., Lansdell, M., Phleger, C.F., Nichols, P.D., 2010. Discrimination of prey species of juvenile swordfish *Xiphias gladius* (Linnaeus 1758) using signature fatty acid analyses. *Prog. Oceanogr.* 86, 139–151.



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Estuarine, Coastal and Shelf Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecss



Trophic relationships in an estuarine environment: A quantitative fatty acid analysis signature approach



Larisa Magnone ^{a,*}, Martin Bessonart ^{a,b}, Juan Gadea ^a, María Salhi ^a

^a Laboratorio de Recursos Naturales, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, CP 11400, Montevideo, Uruguay

^b Estación Experimental de Cultivos Marinos y Acuicultura, Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA), Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), Parque Nacional Cabo Polonio s/n, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2014

Accepted 29 December 2014

Available online 19 January 2015

Keywords:

estuarine food web

QFASA

Rocha Lagoon

coastal lagoons

ABSTRACT

In order to better understand the functioning of aquatic environments, it is necessary to obtain accurate diet estimations in food webs. Their description should incorporate information about energy flow and the relative importance of trophic pathways. Fatty acids have been extensively used in qualitative studies on trophic relationships in food webs. Recently a new method to estimate quantitatively single predator diet has been developed. In this study, a model of aquatic food web through quantitative fatty acid signature analysis was generated to identify the trophic interactions among the species in the Rocha Lagoon. The biological sampling over two consecutive annual periods was comprehensive enough to identify all functional groups in the aquatic food web (except birds and mammals). *Heleobia australis* seemed to play a central role in this estuarine ecosystem. As both, a grazer and a prey to several other species, probably *H. australis* is transferring a great amount of energy to upper trophic levels. Most of the species at Rocha Lagoon have a wide range of prey items in their diet reflecting a complex food web, which is characteristic of extremely dynamic environment as estuarine ecosystems. QFASA is a model in tracing and quantitative estimate trophic pathways among species in an estuarine food web. The results obtained in the present work are a valuable contribution in the understanding of trophic relationships in Rocha Lagoon.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Estuaries are among the most productive natural habitats in the world, and their elevated productivity is maintained by high levels of nutrients in both sediment and water column. These transition zones between land and sea can provide unique ecosystems services ranging from trapping contaminant in their sediments to providing nursery areas for marine fish and feeding grounds for migratory birds (McLusky and Elliot, 2004).

Since Platt and Denman (1978) stated that the structure of aquatic communities of species resulted from trophic interactions, several works have been focused at the ecosystem level,

emphasizing the central role of food web ecology to understand how aquatic systems function (Pasquaud et al., 2007). Despite this, quantitative diet composition at species level are among the least well known and the most uncertain information in most ecosystems (Kavanagh et al., 2004), especially in estuarine and coastal areas where modeling approaches have shown that food web ecology is complex and variable and that trophic spectrum are quite wide (Monaco and Ulanowicz, 1997; Rybarczyk and Elkain, 2003; Giménez et al., 2006).

Several techniques have been used in food web ecology to study trophic relationships such as stomach/gut content analysis, stable isotopes ratios and biochemical markers (fatty acids and sterols) (Elliott and Hemingway, 2002). Since techniques based on stomach content are the ones that have been the most widely used, the majority of the knowledge generated to date derived from this method. However, estimates of diets with this approach present several biases (Hyslop, 1980; Bowen, 2000) in addition to representing only snapshots of recent meals and may therefore not be

* Corresponding author.

E-mail addresses: larisa@fcien.edu.uy (L. Magnone), martinb@fcien.edu.uy (M. Bessonart), juanluisgadea@gmail.com (J. Gadea), msalhi@fcien.edu.uy (M. Salhi).

reliable indicators of long-term diet (Iverson, 2009). More recently, fatty acids and stable isotopes have been used to more specifically identify food web relationships and the strength of interactions among dominant taxa in the estuarine environment (Kharlamenko et al., 2001; Ramos et al., 2003; Persic et al., 2004; Abed-Navandi and Dworschak, 2005; Alfaro et al., 2006; Torres-Ruiz et al., 2007; Alikunhi et al., 2010; Dubois et al., 2014; Prado et al., 2014). Both approaches have advantages and disadvantages, and probably the combination of them constitutes a powerful tool (Alfaro et al., 2006).

Stable isotope ratios of carbon and nitrogen are commonly used to provide information on the trophic position and the contribution of food source of the organisms in a food web. Although useful in addressing a variety of ecological questions, stable isotopes of carbon and nitrogen typically cannot provide quantitative estimates of species composition of diets when more than three species are consumed (Bowen and Iverson, 2013).

Fatty acids have been extensively used in qualitative studies on trophic relationships in food webs (Napolitano, 1999; Iverson et al., 2002; Dalsgaard et al., 2003; Alfaro et al., 2006; Budge et al., 2006, 2007; Rossi et al., 2008; Iverson, 2009; Kelly and Scheibling, 2012). Fatty acids are carbon-rich compounds that are widespread in organisms, and they are relatively easy to metabolize when consumed as part of the animal's diet. Furthermore, their biological specificity, and the fact that some of them (essential fatty acids) are transferred from primary producers to higher trophic levels without major changes, make fatty acids suitable for use as biomarkers (Parrish et al., 2000). Iverson et al. (2004) developed a new method that quantitatively estimates long term predator's diet using fatty acids signatures: Quantitative Fatty Acid Signature Analysis (QFASA).

QFASA method was firstly designed to infer top predator mammal diets. It is a statistical model developed to quantitatively estimate predator diets by means of fatty acids signatures among the predator and its potential preys. The technique involves the combination of prey's FA signatures that most closely resembles the predator's FA stores to thereby infer its diet (Iverson et al., 2004). Up to now, this methodology has been applied in several organisms, like birds and fish, with a good reliability in its estimations (Young et al., 2010; Wang et al., 2010; Budge et al., 2012; Magnone et al., 2015).

Rocha Lagoon is one of the main brackish lagoon ecosystem across the Atlantic ocean in the Uruguayan coastline. It constitutes the most studied and best known coastal lagoon in Uruguay (Sommaruga and Conde, 1990; Fabiano et al., 1998; Vizziano et al., 2002; Norbis and Galli, 2004; Aubriot et al., 2005; Giménez et al., 2006; Rodriguez-Grana et al., 2008; Milessi et al., 2010). As the majority of estuarine coastal environments, it serves as a nursery and sheltering area for migrating birds and fishes (Mianzan et al., 2001; McLusky and Elliot, 2004; Alfaro et al., 2006). Today, this ecosystem is part of a national park located within a biosphere reserve and belongs to a protected area.

Recently, the food web of Rocha Lagoon was studied using stable isotopes analyses (Rodríguez-Grana et al., 2008) and Milessi et al. (2010) contrasted the results obtained by the stable isotope approach to the mass-balance trophic modeling by comparing estimated trophic level assigned to several relevant species with the two methods.

The aim of the present study was to generate a model for the aquatic food web through quantitative fatty acid signature analysis to identify the trophic interactions among the species in the Rocha Lagoon and to contrast the results with previous studies in the same Lagoon using stable isotopes and mass-balance trophic modeling, focusing on those species where energy flow is passing through the system.

2. Materials and methods

2.1. Study area

Rocha Lagoon (Fig. 1) is a brackish, shallow, and microtidal coastal lagoon (mean depth = 0.6 m, area = 72 km²) located on the Atlantic coast of South America (34°38'S, 54°17'W) (Fig. 1) (Sommaruga and Conde, 1990). At irregular intervals of time, a connection with the ocean opens through a restricted inlet in the southernmost region of the lagoon, producing a north–south salinity gradient (Conde et al., 2000).

2.2. Biological sampling

Biological samples were collected from April 2008 to October 2010 at Rocha Lagoon, at four locations (north, south, mouth, and central zone). In this study, we use the term phytoplankton to name the fraction ranging from 5 µm to 50 µm obtained filtering water. Phytoplankton was collected in plastic bottles, filtering the water, previously filtered 50 µm with a vacuum pump trough 5 µm paper filter. Zooplankton refers to those animals which were trapped pumping water between 60 µm and 1 mm mesh. Zooplankton samples were collected with motorized water pumps, filtrating water between 1 mm and 60 µm mesh. Benthic animals were collected using seine nets, corers, dredges and manual collections. Fish were collected using gill and seine nets. Sediments were collected using corers.

Benthic animals and fish (except for *Heteromastus similis*) were counted, measured and weighted (total length with 1 mm precision and wet weight with 0.0001 g precision), and when possible identified at the lowest possible taxonomic level.

2.3. Biochemical analyses

All samples for biochemical procedures were stored at -20 °C until analysis. Lipid extraction and quantification was made in duplicate according to Folch et al. (1957). All organisms were analyzed as a whole prey, as eaten in nature. Organisms and sediment were freeze-dried and homogenized prior to lipid extraction. FA methyl esters (FAMEs) of total lipids were obtained by trans-esterification with H₂SO₄ in methanol solution (Christie, 1982). FAMEs were separated using a gas chromatograph (Hewlett Packard 5890) equipped with a flame ionization detector and a Supelcowax fused silica capillary column (30 m 0.32 mm ID, Supelco, USA) using nitrogen as carrier gas. Samples were injected in split mode at 250 °C. FA were identified by comparing retention times of methyl esters standards (Supelco) and by reference to a well characterized fish oil (Salhi and Bessonart, 2013). FA data were expressed as the mass percentage of total FA ± sd.

2.4. Fatty acid database

The main fatty acid database with all dietary fatty acid profiles of all species/group recognized at Rocha Lagoon in this study was constructed using the average of each and considering 37 fatty acids which covered 97.3 ± 1.3%, as the mass percentage of total fatty acids. The model was run considering each of the items as a predator, with the exception of phytoplankton and sediment. Each time the model was run, a new matrix from the main database was constructed as follows: the first column was always the predator, and subsequent columns were the potential preys for this predator (based in the bibliography for each species and taking into account biological aspects for each functional trophic group). The matrix included also the prey's lipid contents expressed in wet weight, to finally express the results corrected by wet weight lipids. Due to the

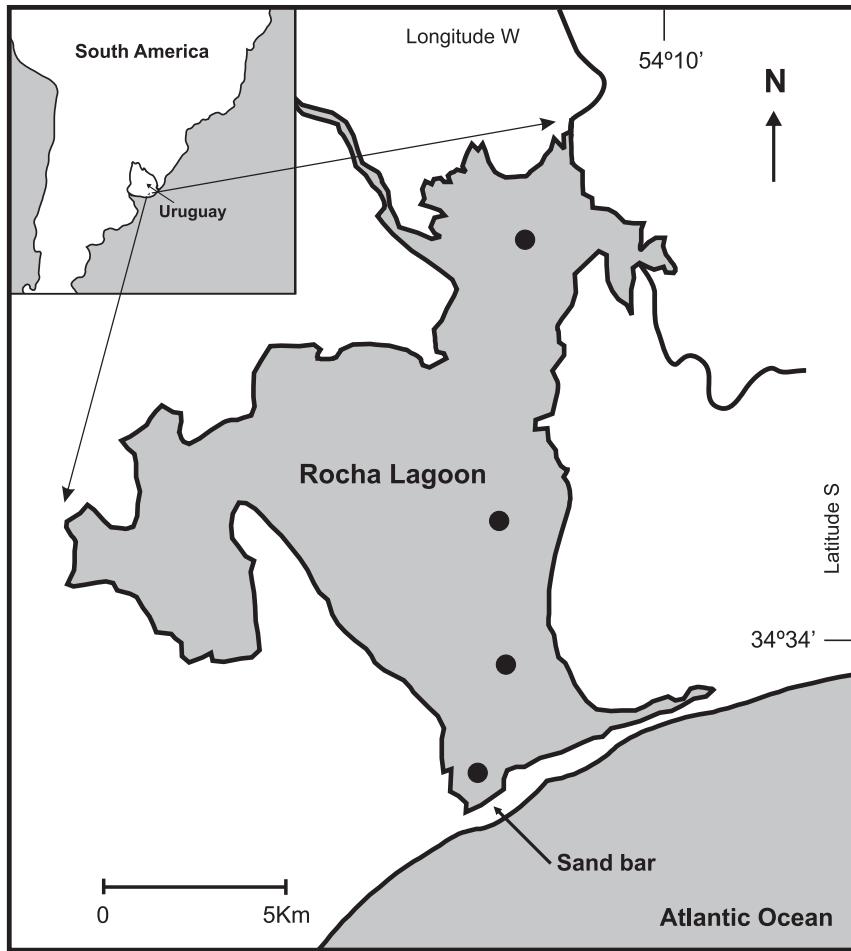


Fig. 1. Study site of Rocha Lagoon. Filled circles indicate sampling zones.

mathematical model used in this analysis is based on the similarity between fatty acid profiles, the species that show cannibalism behavior (as *Paralichthys orbignyanus*) were not considered as prey of themselves, in order not to introduce bias into the results.

2.5. Ecological modeling

The estimation of the diet of each predator group in the food web was obtained by considering a weighted combination of the fatty acid signatures of its preys, and then determining the weighting coefficients that better explain the fatty acid signature of the predator. This was implemented by minimizing the statistical distance between the combination of fatty acid signatures and that of the each predator every time.

Let y be a vector, whose elements y_j describe the proportion of each fatty acid j of the predator. Following (Iverson et al., 2004), the model can be stated as estimating y as a weighted sum \hat{y} of the fatty acids of the prey,

$$\hat{y} = \sum_k p_k \hat{x}_k$$

where \hat{x}_k is a vector, whose elements \hat{x}_{kj} are the mean of each fatty acid j of the prey type k and p_k is a weighting coefficient that corresponds to the estimated proportion of the prey type k in the predator's diet. The goal of the analysis is to choose the p_k values in

order that the model estimation \hat{y} is as close as possible to the real profile y . Since y and \hat{y} are distributions over the fatty acids, the Kullback–Liebler (KL) distance is used to compare fatty acid profiles as,

$$KL = \sum_j (y_j - \hat{y}_j) \log \left(\frac{y_j}{\hat{y}_j} \right).$$

In addition, the p_k values are constrained to be positive and sum to 1. Therefore the estimation can be formulated as an optimization problem with constraints,

$$\min KL = \sum_j (y_j - \hat{y}_j) \log \left(\frac{y_j}{\hat{y}_j} \right)$$

$$\text{subject to } \sum_k p_k = 1, \quad p_k \geq 0.$$

The optimization was carried out in Matlab using its optimization toolbox. As in Iverson et al. (2004), no prior bias for any prey was assumed, so the optimization was initialized with equal values for all p_k coefficients.

Finally, the contribution from each prey to the diet was adjusted according to the fat content of the different prey items.

3. Results

A total of 22 dietary items were collected at Rocha Lagoon. The number of organisms collected, the sized class, wet weight and the number of biochemical analysis are summarized in Table 1. A total of 211 FA signatures were obtained.

All functional groups (recognized in the present work) of the ecosystem were included, except birds at the top of the food web.

The lipid content, main fatty acids, total saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids proportions, and 18:1n7/18:1n9 ratios of all species of groups found at Rocha Lagoon are summarized in Table 2.

The six species of fish sampled included individuals of a wide range of size, from around 3.0 cm–48 cm. Their lipid content (%ww) varied from 0.45 ± 0.05 for *Hoplias malabaricus* to 0.9 ± 0.3 for *Paralichthys orbignyanus*. The other four species of fish had a similar content of lipids (around 1.9 %ww). Twelve items of invertebrates consisting of nine species, one group of Amphipoda, one group of Isopoda and one group of Polychaeta were collected. Three groups can be distinguished regarding their lipid content: Amphipoda, *Heleobia australis* and *Erodona mactroides* had the lowest lipid level (around 0.4 %ww), Isopoda and *Penaeus paulensis* had the highest (around 2.5 %ww) and the rest was intermediate (from around 0.6 to 1.4 %ww). Zooplankton and Phytoplankton had similar lipid level (around 1.5 %ww). Sediment, as expected, had the lowest lipid level 0.0043 %ww.

Regarding fatty acid profile, as expected, each species/group presented a particular FA profile (Table 2). Except crabs, *Palaeomonetes argentinus*, *Penaeus paulensis* and *Heteromastus similis*, the rest had a proportion of 16:0 higher than 20% and, in the case of *Brevoortia aurea*, *Jenynsia multidentata*, *Polychaeta* and *Heleobia australis*, 16:0 represented more than 25% of total FA. The higher proportion of 22:6n-3 was found in *Neomysis americana*, representing more than 20% of total FA, and the lowest (<3% of total FA) in Polychaeta, *H. similis*, Isopoda and *H. australis*. The highest proportions of 20:5n-3 (>10% of total FA) were found in all Crustacea items, being the highest those of *Callinectes sapidus*, *P. argentinus*

and *N. americana* (<15% of total FA). *Heleobia australis* had the lowest proportion of n-3 HUFA due to both, low 20:5n-3 and low 22:6n-3. A relatively high content of 20:4n-6 ($\geq 5\%$ of total FA) was found in *Chasmagnatus granulatus*, *Cryptograpsus angulatus*, *P. argentinus* and *P. paulensis* and the lowest values corresponded to *Polychaeta*. The highest proportions of 18:3n-3 were found in *C. granulatus* and Amphipoda and the highest of 18:2n-6 were found in *J. multidentata*, *C. sapidus*, *C. granulatus*, *P. argentinus* and Amphipoda.

Both plankton fractions showed the largest standard deviations in fatty acid profile associated with the fact that they are large compounds of different species. Both have similar patterns of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, having inverted ratios of 22:3n6/20:5n3, and low values of 22:6n3 for phytoplankton species (7.4% of total FA). Sediment was basically composed of saturated FA (90% of total FA) being almost all 16:0 and 18:0.

The elevated (>1) 18:1n7/18:1n9 ratio could be seen as indicator of herbivory (Falk-Petersen et al., 2000) (Table 2). This trophic lipid biomarker reached the highest value (3.36) in the deposit-feeder polychaete *Heteromastus similis*, revealing probably the FA profile of decaying producers in the sediment. *Heleobia australis*, as grazers, showed 2.10 value indicating their herbivorous feeding habits. The other group of polychaeta also had higher values (2.09). *Erodona mactroides*, as filter species, had a limit value (0.98) indicating probably that are consuming zooplankton and phytoplankton at higher proportions. All other groups (except zooplankton, phytoplankton and sediment) showed values lower than 1, indicating their carnivory.

A graphical representation of food web of Rocha Lagoon is shown in Fig. 2. The arrows are drawn from each species to its preys. The width of the arrows in the picture represent the percentage of the diet, the wider the arrow the higher percentage of the prey in the predator diet. Numbers in circles show how many preys a species consumes. Numbers in square shows how many species or group of species feed on it.

The species or items with a higher number of predators were phytoplankton (9), *Neomysis americana* (8), *Heleobia australis* (7)

Table 1

Sample size and size of items sampled at Rocha Lagoon. x = mean, sd = standard deviation. Min: minimum, Max: maximum. FA: Fatty acids.

| Items | Number of individuals | Number of samples analyzed for lipids and FA | Length (x ± sd) or min–max (cm) | Weight (x ± sd) or min–max (g) |
|---------------------------------------|-----------------------|--|---------------------------------|--------------------------------|
| Fishes | | | | |
| <i>Paralichthys orbignyanus</i> adult | 17 | 17 | 48.03 ± 6.43 | 1353 ± 684 |
| <i>Paralichthys orbignyanus</i> young | 8 | 8 | 18.46 ± 2.16 | 55.51 ± 19.08 |
| <i>Odontesthes bonaerensis</i> | 13 | 13 | 15.05 ± 2.47 | 24.63 ± 10.49 |
| <i>Hoplias malabaricus</i> | 5 | 5 | 28.54 ± 3.58 | 619.5 ± 208.5 |
| <i>Micropogonias furnieri</i> | 12 | 6 | 3.90–19.30 | 0.60–64.00 |
| <i>Brevoortia aurea</i> | 14 | 14 | 5.10–20.40 | 10.50–20.40 |
| <i>Jenynsia multidentata</i> | 36 | 7 | 3.01 ± 0.42 | 0.30 ± 0.13 |
| Invertebrates | | | | |
| <i>Callinectes sapidus</i> | 24 | 6 | 1.74 ± 0.43 | 0.43 ± 0.31 |
| <i>Chasmagnatus granulatus</i> | 51 | 17 | 2.51 ± 0.21 | 9.24 ± 1.97 |
| <i>Cryptograpsus angulatus</i> | 48 | 18 | 1.99 ± 0.57 | 3.87 ± 2.47 |
| <i>Palaemonetes argentinus</i> | 18 | 12 | 2.17 ± 0.85 | 2.15 ± 0.99 |
| <i>Penaeus paulensis</i> | 25 | 5 | 10.80–18.00 | 7.30–31.00 |
| <i>Neomysis americana</i> | 400 | 7 | 1.35 ± 0.16 | 0.01 ± 0.00 |
| Polychaete | 258 | 5 | 3.29 ± 0.81 | 0.00 ± 0.00 |
| <i>Heteromastus similis</i> | 31 | 3 | — | — |
| Amphipoda | 585 | 8 | 0.60 ± 0.20 | 0.01 ± 0.00 |
| Isopoda | 63 | 7 | 0.99 ± 0.34 | 0.02 ± 0.01 |
| <i>Heleobia australis</i> | 263 | 8 | 5.90 ± 1.26 | 0.02 ± 0.01 |
| <i>Erodona mactroides</i> | 88 | 11 | 12.00 ± 3.70 | 0.50 ± 0.25 |
| Zooplankton (60 µm–1mm) | — | 12 | — | — |
| Producers | | | | |
| Phytoplankton (5 µm–50 µm) | — | 17 | — | — |
| Organic matter | | | | |
| Sediment | — | 5 | — | — |

Table 2

Main fatty acids composition (% of total FA) of the items of Rocha lagoon. Values are expressed as mean \pm standard deviation.

| | <i>Paralichthys orbignyanus</i> adults | <i>Hoplias malabaricus</i> | <i>Odontesthes argentinensis</i> | <i>Micropogonias furnieri</i> | <i>Brevoortia aurea</i> | <i>Paralichthys orbignyanus</i> young | <i>Jenynsia multidentata</i> | <i>Callinectes sapidus</i> | <i>Chasmagnathus granulatus</i> | <i>Cryptopagrus angulatus</i> | <i>Palaemonetes argentinus</i> |
|--------------------------|--|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Lip % WW | 0.8 \pm 0.3 | 0.45 \pm 0.05 | 1.8 \pm 0.3 | 1.8 \pm 1.1 | 2.1 \pm 1.2 | 0.9 \pm 0.3 | 1.7 \pm 0.4 | 0.9 \pm 0.5 | 0.6 \pm 0.3 | 0.8 \pm 0.3 | 0.9 \pm 0.1 |
| FA % Area | | | | | | | | | | | |
| 14:0 | 2.3 \pm 0.9 | 2.3 \pm 1.1 | 3.5 \pm 1.7 | 1.7 \pm 0.8 | 8.6 \pm 1.9 | 2.1 \pm 1.01 | 3.0 \pm 0.9 | 1.8 \pm 1.0 | 1.8 \pm 0.6 | 1.8 \pm 0.3 | 1.6 \pm 0.3 |
| 16:0 | 22.7 \pm 4.1 | 21.8 \pm 1.5 | 23.5 \pm 3.2 | 21.4 \pm 2.8 | 26.1 \pm 5.5 | 20.1 \pm 12.92 | 27.1 \pm 3.5 | 15.0 \pm 2.2 | 17.1 \pm 3.3 | 19.1 \pm 1.8 | 14.0 \pm 0.8 |
| 16:2 | 1.0 \pm 0.2 | 1.0 \pm 0.1 | 0.6 \pm 0.2 | 1.0 \pm 0.4 | 1.7 \pm 0.4 | 0.5 \pm 0.23 | 0.6 \pm 0.3 | 1.1 \pm 0.6 | 0.4 \pm 0.4 | 0.2 \pm 0.1 | 0.4 \pm 0.3 |
| 18:0 | 7.4 \pm 1.3 | 12.6 \pm 1.4 | 6.2 \pm 2.1 | 11.3 \pm 2.2 | 6.2 \pm 2.3 | 7.7 \pm 5.44 | 11.6 \pm 1.7 | 7.7 \pm 1.1 | 6.7 \pm 1.4 | 6.5 \pm 1.0 | 7.2 \pm 0.3 |
| 18:1n-9 | 13.2 \pm 3.1 | 12.6 \pm 3.0 | 16.0 \pm 4.8 | 11.5 \pm 0.5 | 14.0 \pm 3.4 | 9.9 \pm 6.42 | 13.2 \pm 2.3 | 6.1 \pm 0.7 | 11.2 \pm 2.0 | 9.6 \pm 2.9 | 12.5 \pm 0.8 |
| 18:2n-6 | 1.6 \pm 0.6 | 3.6 \pm 0.5 | 1.2 \pm 0.7 | 1.2 \pm 0.3 | 1.3 \pm 0.3 | 1.3 \pm 0.75 | 3.7 \pm 1.4 | 3.6 \pm 2.9 | 5.1 \pm 1.4 | 2.6 \pm 1.0 | 3.4 \pm 1.3 |
| 18:3n-3 | 0.9 \pm 0.4 | 1.7 \pm 0.5 | 1.1 \pm 0.1 | 0.7 \pm 0.6 | 1.0 \pm 0.7 | 0.9 \pm 0.56 | 1.0 \pm 0.3 | 1.7 \pm 0.7 | 3.2 \pm 1.8 | 2.1 \pm 0.7 | 1.8 \pm 0.2 |
| 20:1 | 1.1 \pm 0.7 | 1.6 \pm 0.4 | 1.6 \pm 0.6 | 2.7 \pm 2.5 | 3.4 \pm 0.7 | 1.6 \pm 0.61 | 1.5 \pm 0.3 | 3.2 \pm 1.9 | 1.6 \pm 0.4 | 2.7 \pm 1.0 | 1.6 \pm 0.3 |
| 20:2n-6 | 0.2 \pm 0.1 | 0.9 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.1 | 0.6 \pm 0.2 | 0.2 \pm 0.14 | 0.3 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.4 | 0.8 \pm 0.2 | 0.9 \pm 0.2 | 0.7 \pm 0.2 |
| 20:4n-6 | 3.9 \pm 1.4 | 7.8 \pm 2.2 | 2.6 \pm 1.2 | 3.2 \pm 1.4 | 0.7 \pm 0.3 | 3.1 \pm 0.92 | 3.1 \pm 0.9 | 4.8 \pm 2.3 | 6.1 \pm 2.3 | 5.6 \pm 0.9 | 5.3 \pm 1.2 |
| 20:5n-3 | 3.5 \pm 1.3 | 2.2 \pm 0.3 | 4.9 \pm 2.0 | 4.8 \pm 1.3 | 4.1 \pm 2.7 | 1.7 \pm 0.79 | 0.9 \pm 0.4 | 17.1 \pm 2.1 | 11.8 \pm 4.1 | 13.3 \pm 3.1 | 17.1 \pm 0.4 |
| 22:1 | 0.4 \pm 0.2 | 0.4 \pm 0.0 | 0.6 \pm 0.4 | 1.0 \pm 0.3 | 0.7 \pm 0.1 | 0.9 \pm 0.36 | 0.7 \pm 0.2 | 1.0 \pm 1.0 | 0.6 \pm 0.4 | 0.8 \pm 0.3 | 0.4 \pm 0.0 |
| 22:5n-3 | 3.2 \pm 1.1 | 3.2 \pm 0.4 | 3.4 \pm 1.4 | 2.4 \pm 0.6 | 1.1 \pm 0.6 | 1.6 \pm 0.41 | 1.5 \pm 0.6 | 2.3 \pm 0.5 | 0.7 \pm 0.3 | 1.1 \pm 0.3 | 1.0 \pm 0.1 |
| 22:6n-3 | 17.4 \pm 7.3 | 11.1 \pm 2.9 | 13.1 \pm 3.5 | 12.9 \pm 8.8 | 5.9 \pm 3.3 | 6.4 \pm 3.54 | 3.9 \pm 1.7 | 7.4 \pm 4.1 | 5.0 \pm 2.4 | 5.3 \pm 1.1 | 7.8 \pm 0.4 |
| Saturated | 38.1 \pm 7.7 | 36.9 \pm 2.7 | 36.6 \pm 7.7 | 37.4 \pm 4.6 | 45.0 \pm 8.0 | 33.5 \pm 22.02 | 50.0 \pm 7.6 | 27.0 \pm 2.8 | 30.4 \pm 4.0 | 31.5 \pm 2.7 | 25.9 \pm 0.5 |
| Monoinsaturated | 25.5 \pm 6.5 | 25.1 \pm 4.8 | 30.9 \pm 4.1 | 26.9 \pm 7.8 | 31.7 \pm 4.4 | 23.2 \pm 14.34 | 31.1 \pm 2.2 | 24.1 \pm 5.7 | 28.4 \pm 5.8 | 29.3 \pm 3.8 | 29.2 \pm 1.0 |
| Polyunsaturated | 35.6 \pm 10.3 | 38.1 \pm 5.2 | 32.5 \pm 6.9 | 29.5 \pm 4.0 | 23.3 \pm 8.9 | 20.0 \pm 6.39 | 18.9 \pm 6.8 | 32.4 \pm 9.8 | 41.2 \pm 9.1 | 39.2 \pm 5.4 | 44.9 \pm 0.5 |
| n-9 | 15.4 \pm 3.4 | 14.5 \pm 3.3 | 18.2 \pm 4.9 | 14.7 \pm 3.2 | 18.0 \pm 3.9 | 11.5 \pm 8.13 | 16.0 \pm 2.6 | 8.5 \pm 3.5 | 13.6 \pm 2.4 | 12.8 \pm 3.4 | 14.7 \pm 0.7 |
| n-6 | 7.4 \pm 1.8 | 13.8 \pm 2.0 | 5.3 \pm 1.6 | 6.7 \pm 1.8 | 3.9 \pm 0.7 | 5.2 \pm 1.64 | 7.9 \pm 2.6 | 11.6 \pm 4.8 | 13.2 \pm 2.4 | 10.3 \pm 1.8 | 10.2 \pm 0.3 |
| n-3 | 26.9 \pm 8.7 | 20.3 \pm 3.1 | 24.3 \pm 5.3 | 22.5 \pm 8.6 | 14.9 \pm 7.7 | 11.8 \pm 4.23 | 9.0 \pm 3.1 | 30.9 \pm 4.7 | 24.2 \pm 7.1 | 25.3 \pm 4.4 | 32.1 \pm 0.3 |
| n-3 HUFA | 25.0 \pm 8.7 | 17.5 \pm 3.3 | 22.0 \pm 5.5 | 20.6 \pm 9.6 | 12.1 \pm 6.8 | 9.9 \pm 4.50 | 6.8 \pm 2.7 | 27.6 \pm 5.3 | 18.2 \pm 6.6 | 20.5 \pm 3.7 | 26.8 \pm 0.2 |
| 18:1n7/18:1n9 | 0.29 | 0.34 | 0.35 | 0.42 | 0.24 | 0.42 | 0.36 | 0.55 | 0.48 | 0.64 | 0.67 |
| Penaeus paulensis | | Neomysis americana | Polychaete | Heteromastus similis | Amphipoda | Isopoda | Heleobia australis | Erodona mactroides | Zooplankton | Phytoplankton | Sediment |
| Lip % WW | 2.1 \pm 0.2 | 0.7 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.1 | 1.4 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.1 | 2.5 \pm 0.5 | 0.5 \pm 0.3 | 0.40 \pm 0.0 | 1.38 \pm 0.65 | 1.68 \pm 0.54 | 0.0043 \pm 0.0023 |
| FA % Area | | | | | | | | | | | |
| 14:0 | 1.8 \pm 0.5 | 1.8 \pm 0.2 | 5.0 \pm 1.5 | 5.3 \pm 0.4 | 2.3 \pm 0.0 | 4.0 \pm 0.2 | 4.7 \pm 1.2 | 2.7 \pm 0.4 | 7.54 \pm 4.81 | 5.6 \pm 1.02 | 1.95 \pm 0.26 |
| 16:0 | 15.7 \pm 3.3 | 23.1 \pm 0.8 | 24.8 \pm 2.1 | 13.4 \pm 1.3 | 18.8 \pm 1.4 | 20.2 \pm 2.0 | 25.9 \pm 4.4 | 22.6 \pm 4.2 | 17.98 \pm 7.65 | 20.8 \pm 3.93 | 26.47 \pm 1.45 |
| 16:2 | 0.5 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.0 | 1.0 \pm 0.2 | 0.8 \pm 0.5 | 0.4 \pm 0.1 | 1.7 \pm 0.3 | 2.0 \pm 0.8 | 1.3 \pm 0.7 | 0.52 \pm 0.44 | 0.6 \pm 0.45 | 0.02 \pm 0.03 |
| 18:0 | 7.9 \pm 1.8 | 4.3 \pm 0.3 | 8.0 \pm 0.8 | 3.6 \pm 1.2 | 4.7 \pm 1.5 | 3.4 \pm 1.1 | 15.8 \pm 2.7 | 5.4 \pm 1.5 | 4.98 \pm 2.16 | 7.8 \pm 1.94 | 51.78 \pm 3.66 |
| 18:1n-9 | 7.8 \pm 1.1 | 7.7 \pm 0.5 | 4.0 \pm 0.4 | 3.0 \pm 0.3 | 11.8 \pm 0.3 | 8.5 \pm 0.5 | 2.3 \pm 0.9 | 2.9 \pm 1.0 | 8.14 \pm 4.53 | 9.3 \pm 3.39 | 1.54 \pm 0.26 |
| 18:2n-6 | 3.0 \pm 1.5 | 1.6 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.0 | 2.3 \pm 0.3 | 3.6 \pm 1.9 | 1.6 \pm 0.2 | 1.8 \pm 1.2 | 0.9 \pm 0.1 | 1.52 \pm 1.46 | 1.5 \pm 1.67 | 0.17 \pm 0.07 |
| 18:3n-3 | 1.3 \pm 0.6 | 1.2 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.0 | 1.7 \pm 0.5 | 3.5 \pm 1.3 | 1.1 \pm 0.2 | 1.8 \pm 0.6 | 2.3 \pm 0.4 | 3.75 \pm 2.76 | 3.1 \pm 1.01 | 0.11 \pm 0.11 |
| 20:1 | 4.0 \pm 1.0 | 1.5 \pm 0.1 | 5.0 \pm 0.7 | 4.9 \pm 0.0 | 2.5 \pm 0.3 | 1.2 \pm 0.0 | 4.9 \pm 1.6 | 4.7 \pm 1.5 | 4.58 \pm 3.86 | 3.7 \pm 1.31 | 0.09 \pm 0.16 |
| 20:2n-6 | 1.0 \pm 0.2 | 0.0 \pm 0.0 | 0.5 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | 0.4 \pm 0.2 | 0.9 \pm 0.0 | 0.09 \pm 0.10 | 0.1 \pm 0.16 | 0.04 \pm 0.06 |
| 20:4n-6 | 5.0 \pm 0.4 | 2.4 \pm 0.0 | 1.1 \pm 0.3 | 3.6 \pm 0.3 | 4.8 \pm 1.7 | 3.1 \pm 0.2 | 2.7 \pm 1.8 | 2.2 \pm 0.1 | 0.66 \pm 0.36 | 0.5 \pm 0.43 | 0.02 \pm 0.01 |
| 20:5n-3 | 14.2 \pm 3.4 | 16.5 \pm 1.3 | 5.7 \pm 2.1 | 8.5 \pm 0.2 | 12.8 \pm 0.5 | 14.2 \pm 1.1 | 2.5 \pm 2.0 | 7.2 \pm 3.7 | 3.66 \pm 1.07 | 1.3 \pm 1.55 | 0.04 \pm 0.06 |
| 22:1 | 0.7 \pm 0.3 | 0.5 \pm 0.0 | 1.5 \pm 0.6 | 1.1 \pm 0.3 | 0.9 \pm 0.2 | 0.8 \pm 0.5 | 4.0 \pm 1.8 | 1.1 \pm 0.3 | 6.09 \pm 4.55 | 4.4 \pm 1.65 | 0.22 \pm 0.14 |
| 22:5n-3 | 3.4 \pm 0.8 | 0.9 \pm 0.1 | 1.8 \pm 0.6 | 3.2 \pm 0.4 | 1.2 \pm 0.7 | 0.5 \pm 0.0 | 0.5 \pm 0.4 | 2.0 \pm 0.8 | 0.28 \pm 0.30 | 0.2 \pm 0.21 | 0.07 \pm 0.02 |
| 22:6n-3 | 5.6 \pm 1.4 | 21.1 \pm 2.0 | 0.9 \pm 0.5 | 1.6 \pm 0.2 | 4.2 \pm 2.0 | 1.9 \pm 0.1 | 2.7 \pm 1.5 | 7.0 \pm 3.3 | 4.34 \pm 1.31 | 7.4 \pm 4.91 | 0.04 \pm 0.01 |
| Saturated | 29.4 \pm 2.3 | 32.8 \pm 1.3 | 44.6 \pm 3.0 | 27.2 \pm 7.3 | 29.7 \pm 1.1 | 29.5 \pm 3.0 | 52.3 \pm 5.9 | 35.2 \pm 8.4 | 43.13 \pm 12.77 | 41.7 \pm 8.13 | 90.36 \pm 2.57 |
| Monoinsaturated | 27.2 \pm 2.9 | 16.1 \pm 1.1 | 33.5 \pm 1.4 | 32.4 \pm 3.1 | 30.3 \pm 1.2 | 36.3 \pm 2.5 | 25.6 \pm 0.9 | 25.7 \pm 1.8 | 33.28 \pm 7.11 | 29.4 \pm 6.99 | 4.35 \pm 1.71 |
| Polyunsaturated | 31.3 \pm 6.1 | 51.1 \pm 2.4 | 21.9 \pm 3.7 | 31.9 \pm 7.8 | 40.0 \pm 0.1 | 24.9 \pm 12.7 | 22.2 \pm 5.0 | 39.1 \pm 7.9 | 23.59 \pm 8.21 | 28.4 \pm 2.70 | 5.28 \pm 1.85 |
| n-9 | 10.6 \pm 4.0 | 10.4 \pm 0.4 | 10.2 \pm 1.9 | 8.1 \pm 5.6 | 14.6 \pm 0.2 | 9.9 \pm 1.0 | 8.8 \pm 1.7 | 9.2 \pm 0.6 | 12.25 \pm 6.07 | 10.3 \pm 3.32 | 2.15 \pm 0.42 |
| n-6 | 11.8 \pm 1.5 | 5.4 \pm 0.1 | 3.0 \pm 0.4 | 10.4 \pm 2.2 | 10.5 \pm 0.2 | 6.2 \pm 1.1 | 5.7 \pm 3.6 | 6.2 \pm 0.7 | 6.79 \pm 4.21 | 5.1 \pm 2.38 | 0.49 \pm 0.35 |
| n-3 | 26.7 \pm 3.5 | 41.5 \pm 3.2 | 15.5 \pm 3.2 | 19.8 \pm 3.2 | 26.6 \pm 0.2 | 20.8 \pm 2.3 | 10.8 \pm 2.2 | 27.5 \pm 7.8 | 18.32 \pm 5.54 | 18.8 \pm 4.03 | 0.44 \pm 0.30 |
| n-3 HUFA | 24.0 \pm 4.8 | 40.1 \pm 3.2 | 8.7 \pm 3.1 | 13.9 \pm 0.9 | 19.8 \pm 1.6 | 17.3 \pm 1.3 | 6.5 \pm 2.0 | 17.4 \pm 7.7 | 12.24 \pm 5.21 | 13.3 \pm 3.79 | 0.33 \pm 0.18 |
| 18:1n7/18:1n9 | 0.55 | 0.37 | 2.09 | 3.36 | 0.57 | 0.58 | 2.10 | 0.98 | — | — | — |

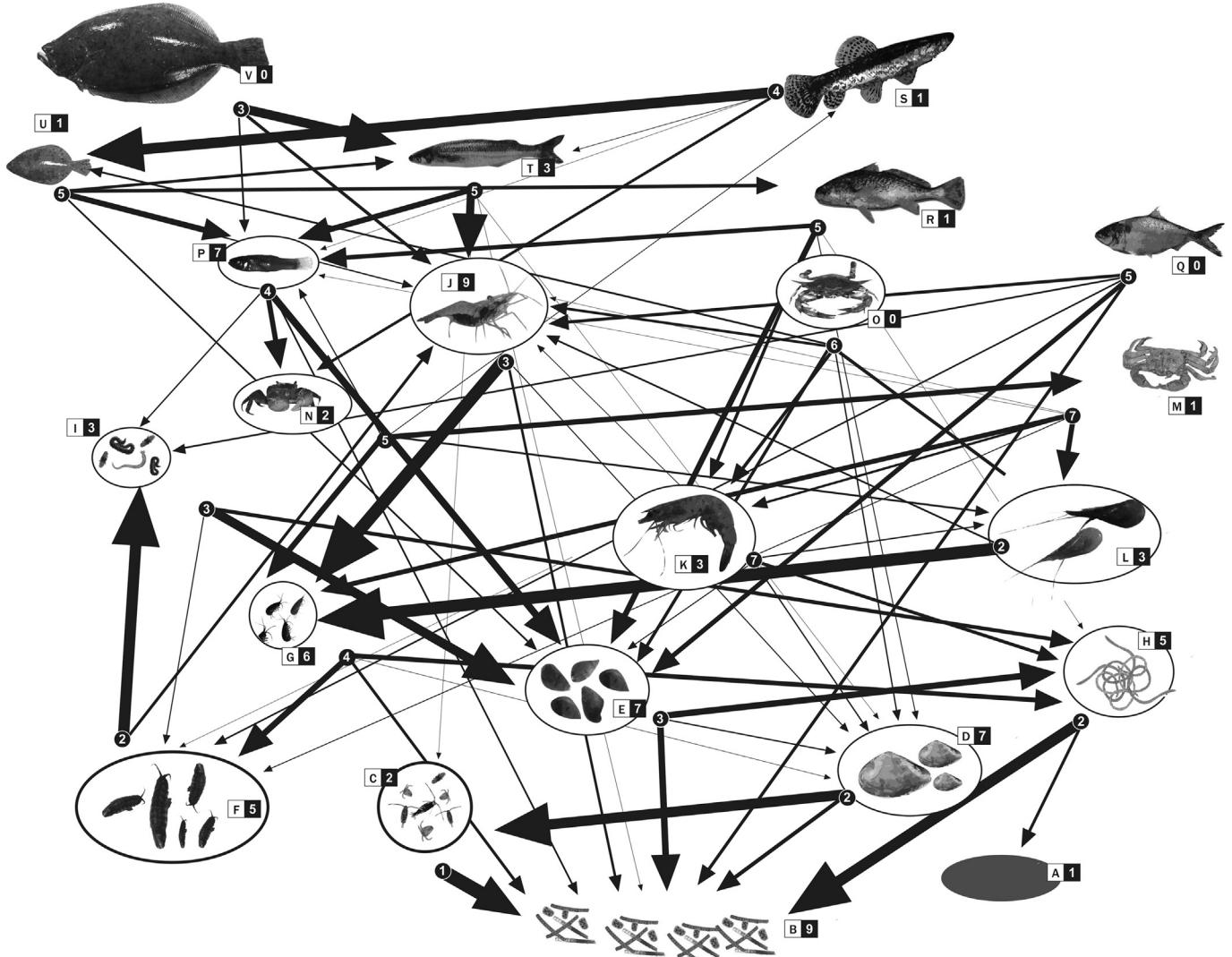


Fig. 2. Graphic representation of quantitative trophic relationships at Rocha Lagoon inferred with fatty acid profile of each group sampled. The width of the arrows represents the quantity of prey eaten. The sum of all arrows for each group represents 100% of the diet. Numbers in circles represents the number of prey eaten for each group. Numbers in square represents how many time each group are eaten. A. Sediment. B. Phytoplankton. C. Zooplankton. D. *Erodona mactroides*. E. *Heleobia australis*. F. *Isopoda*. G. *Amphipoda*. H. *Heteromastus similis*. I. *Polychaete*. J. *Neomysis americana*. K. *Penaeus paulensis*. L. *Palaemonetes argentinus*. M. *Cryptograpsus angulatus*. N. *Chasmagnathus granulatus*. O. *Callinectes sapidus*. P. *Jenynsia multidentata*. Q. *Brevoortia aurea*. R. *Micropogonias furnieri*. S. *Hoplias malabaricus*. T. *Odontesthes argentinensis*. U. *Paralichthys orbignyanus* (young). V. *Paralichthys orbignyanus* (adult).

and *Erodona mactroides* (7). The items of the web that showed a higher importance as preys considering the sum of diet percentage that they represent for the different predators were: Amphipoda, Phytoplankton and *H. australis* (the most consumed items). The species not consumed in the food web of Rocha Lagoon were: adults of *Paralichthys orbignyanus*, *Brevoortia aurea* and *Callinectes sapidus* (excepting birds and humans). The species or items with fewer predators were: *Hoplias malabaricus* (1), *Micropogonias furnieri* (1), *Cryptograpsus angulatus* (1), juveniles of *P. orbignyanus* (1) and Sediments (1).

Paralichthys orbignyanus and three species of crustacean (*Cryptograpsus angulatus*, *Penaeus paulensis* and *Chasmagnathus granulatus*) were the species with more generalist diet (filled circles in Fig. 2). At the same time, this species are little consumed in the food web (by one to three species).

A group of invertebrates, three crustacean (*Palaemonetes argentinus*, *Neomysis americana* and *Isopoda*) polychaete, and two mollusks (*Heleobia australis* and *Erodona mactroides*) were the

species or group of species with narrow diets (three or less preys, filled circles in Fig. 2).

Numerical results of the quantitative diet estimation using fatty acids are summarized in Table 3. Each column corresponds to a single run of QFASA model for a predator indicated in column header. The results are expressed in percentage of the diet after being corrected by lipid content.

4. Discussion

In order to better understand the functioning of aquatic environments, it is necessary to obtain accurate diet estimations in food webs (Pasquaud et al., 2007). For a long time, fatty acids have been used to trace trophic pathways, showing only qualitative trophic relationships bounded to a single or few links in aquatics food webs (John and Lund, 1996; Léveillé et al., 1997; Falk-Petersen et al., 2002; Stübing and Hagen, 2003). More recently some works have used fatty acids to investigate -in qualitative form-food webs

Table 3

Numerical results of the diet compositions of each species or group of species found in Rocha Lagoon, expressed as percentage, after QFASA model was applied.

| Species/groups | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| <i>Paralichthys orbignyanus</i> adult (1) | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Hoplias malabaricus</i> (2) | — | — | — | — | — | — | — | — | 5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Odontesthes argentinensis</i> (3) | 66 | 4 | — | — | — | 20 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Micropogonias furnieri</i> (4) | — | — | — | — | — | 25 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Brevoortia aurea</i> (5) | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Paralichthys orbignyanus</i> young (6) | — | 75 | — | — | — | — | — | — | — | 5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Jenynsia multidentata</i> (7) | 12 | 2 | 40 | 31 | — | 34 | — | — | 4 | 2 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Callinectes sapidus</i> (8) | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Chasmagnathus granulatus</i> (9) | — | 19 | — | — | — | — | 36 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Cryptograpsus angulatus</i> (10) | — | — | — | — | — | — | — | 38 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Penaeus paulensis</i> (11) | — | — | — | 22 | — | — | — | 23 | — | 16 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Pelaemonetes argentinus</i> (12) | — | — | — | — | — | — | — | 28 | 13 | 36 | 7 | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Neomysis americana</i> (13) | 22 | — | 56 | — | 22 | 9 | — | 18 | — | 2 | 5 | 12 | — | — | — | — | — | — | — | |
| Polychaete (14) | — | — | — | — | 12 | — | 9 | — | — | — | — | — | — | — | — | 20 | — | — | — | |
| Amphipoda (15) | — | — | — | — | — | — | — | 40 | 34 | 59 | 88 | 89 | — | — | 80 | — | — | — | — | |
| Isopoda (16) | — | — | — | — | 11 | — | — | — | 5 | 1 | — | — | 7 | 43 | — | — | — | — | — | |
| <i>Heleobia australis</i> (17) | — | — | — | 40 | 33 | 12 | 50 | 22 | — | 10 | — | — | 66 | — | — | — | — | — | — | |
| <i>Heteromastus similis</i> (18) | — | — | — | — | 1 | — | — | — | — | 11 | — | — | 27 | 34 | — | 45 | — | — | — | |
| <i>Erodona macrotridea</i> (19) | — | — | 1 | 6 | — | — | — | 9 | — | — | 7 | — | 5 | — | 3 | — | 9 | — | — | |
| Zooplankton (20) | — | — | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 73 | — | — | |
| Phytoplankton | — | — | 2 | — | 22 | — | 5 | — | — | — | — | — | 6 | — | 20 | — | 46 | 80 | 27 | |
| Sediment | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 20 | — | — | |

spatial patterns and trophic relationships (Hall et al., 2006; Budge et al., 2007; Yunping and Jaffé, 2007). Iverson et al. (2004) have developed for top predator mammals, a new method to quantitatively estimate its diet (QFASA). Since then, several works have applied this method to other mammals, birds and fish (Thiemann et al., 2008; Wang et al., 2010; Elsdon, 2010; Williams and Buck, 2010; Magnone et al., 2015). This approach uses a statistical model, combined with calibration coefficients to account for predator metabolism and a comprehensive prey fatty acids database, to quantitatively estimate their diets from their fatty acids stores. Some authors consider that for the application of this model is necessary to obtain calibration coefficients (CCs) of the predator, to introduce into the model the effect of its metabolism (Iverson et al., 2004; Budge et al., 2006). These CCs are obtained from controlled feeding experiments. However some studies have recently highlighted a tendency to overestimate the presence of the item used as prey for CC calculations, remarking that the use of the model without CCs is sufficiently robust (Budge et al., 2012; Rosen and Tollit, 2012; Magnone et al., 2015). In this study, we applied QFASA to quantitatively estimate the trophic relationships in an estuarine food web without CCs.

Since the Rocha Lagoon is regularly connected with the sea, it has a salinity gradient that could lead us to assume the existence of two different biological assemblages either at the mouth (south) or in the north. However, Rodríguez-Graña et al. (2008) established that despite environmental differences between the freshwater and brackish ends of the Rocha Lagoon, the biological assemblage structure and the general trophic pattern were similar at both sites over an annual period. The biological sampling of the preset study in Rocha Lagoon carried out over two consecutive annual periods was comprehensive enough to identify all functional groups in the aquatic food web. Mammal and birds were out of the scope of this work and were not included, neither macrophytes considering their direct consumption are proposed as marginal (Rodríguez-Graña et al., 2008).

In the analysis of the food web obtained through fatty acids, it could be noted that there are some relevant species into the aquatic ecosystem, because of the elevated links connecting them to the other species within the food web, which probably constitutes the nodes where energy flow is passing through (*Heleobia australis* and *Neomysis americana*).

There is no consensus on the definition of keystone species. Paine (1969) defined it as those species with great impact on its community compared to its relatively low abundance and biomass. David (2003) proposed an alternative defining it as “Any species identified *a priori* as biomass-dominant within its occupied functional groups” and Coll and Librato (2012) modified this definition considering as those abundant species and their high overall impact on a system. Despite this, knowing the keystone species within an aquatic food web -although controversial-is still useful (Paine, 1995).

Following David (2003) definition in this study we consider *Heleobia australis* a keystone species. Among the species observed in this work *Heleobia australis* seems to be a central species of Rocha Lagoon since its grazer feeding habits is transferring energy to upper trophic levels and many species feed on it. Rodríguez-Graña et al. (2008) suggested that this species prey on macrophytes and periphyton and we found at least seven groups are eaten on it.

Although an estimate of biomass of Rocha Lagoon species has not been conducted in the present study, some authors have pointed out that the biomass of this gastropod is very high (~50% of the system's total biomass) and at the same time they consume a high fraction of primary production (Milessi et al., 2010).

The main difference observed between previous studies and the results obtained in the present work is the importance that QFASA assigned to *Heleobia australis* as an item consumed by several species, that leaded as to consider it as a key stone, whereas Milessi et al. (2010) assigned to it a low ecotrophic efficiency (EE, 0.031), which means they are poorly consumed into the ecosystem.

In continental aquatic ecosystems, the benthic macro-invertebrates can be considered the main community responsible for secondary production (Grubaugh et al., 1997). Gastropods of the family Hydrobiidae, have been extensively studied as they are found in many estuaries and coastal lagoons in Europe and South America (Lillebo et al., 1999; De Francesco and Isla, 2004). Callisto et al. (1998) found that *Heleobia australis* constitutes more than 80% of the biomass of the macrobenthic organisms in a coastal lagoon of Rio de Janeiro. Figueiredo-Barros et al. (2006) working in the same coastal lagoon stated that these snails transform low nutritional value substance into biomass of high nutritional quality. A single fatty acid marker for herbivory as the ratio 18:1n7/18:n9 > 1 (Falk-Petersen et al., 2000) was checked for all species in

Rocha Lagoon. *Heleobia australis* showed an elevated value (2.10) of this trophic biomarker confirming their herbivorous habits. This species are feeding on phytoplankton (Fig. 2) and probably on other plant material from macrophytes degradation (plants are present only few months per year in the North of Rocha Lagoon) (Arocena, 2007). The presence of *Heteromastus similis* in the *Heleobia australis* diet is confusing. Since *H. australis* is proposed as detritivores (Figueiredo-Barros et al., 2006) it is quite possible that the prevalence of *Heteromastus similis* in its diet was due to the fact that this deposit feeder polychaete accumulates sediments in its digestive tract reflecting the detritus of the sediment in its fatty acid profile.

Neomysis americana seems to be another crucial species in Rocha Lagoon food web, since it is consumed by a high number of species, and probably a considerable amount of energy is passing through them. Mysids are recognized as an important link between primary producers and higher trophic levels transferring energy as intermediate prey (Schiariti et al., 2006; Vilas et al., 2008). But unlike *Heleobia australis* the biomass of this species is low (Rodríguez-Graña et al., 2008), so probably they carry out this energy transfer in those seasons where its biomass is high. As mentioned by other authors (Richoux et al., 2005) *N. americana* also showed a ratio of DHA/EPA > 1, different from that found generally in crustaceans. This fact could be affecting or biasing the determination of the presence of this species in the diet of other species. These results are in concordance with previous studies where this species was recognized by having a central role in the food web (Rodríguez-Graña et al., 2008; Milessi et al., 2010), being a prey for several upper trophic levels and as a predator of many groups.

Erodona mactroides constituted another species highly consumed into the food web. Despite this fact, all species which fed on it have a low percentage of this species into their diets (Table 3). Although high densities of *E. mactroides* are found in Rocha Lagoon (Giménez et al., 2005) it is probable that this species does not constitutes a key role in transferring energy through the food web. Rodriguez-Graña et al. (2008) and Milessi et al. (2010) also state that this species presents an elevated biomass in the Rocha Lagoon, with low trophic level and low EE (0.110, Milessi et al., 2010).

Paralichthys orbignyanus and *Hoplias malabaricus* are fish with medium–high trophic level (3.78 and 3.76 respectively) at Rocha Lagoon (Milessi et al., 2010) and in this study they are not consumed by any other species with the exception of some *H. malabaricus* (probably fingerlings) eaten by *Chasmagnathus granulatus*, a crab very abundant in the North part of the Rocha Lagoon. *Paralichthys orbignyanus* plays an important role in the system associated with the energy transfer because it is characterized as a marine/estuarine fish that breed in the sea and uses the lagoon for foraging and it also constitutes an important resource for small-scale coastal fisheries in Rocha Lagoon (Vitancurt and Fagetti, 1995).

Surprisingly, despite *Brevoortia aurea* has been considered by Milessi et al. (2010) as a species with a medium trophic level (2.93) at Rocha Lagoon in this study appears without predators among fish. *Micropogonias furnieri* included also among the highest trophic levels (3.40) appears to be eaten only by flatfish juveniles. Both species are also target of small-scale coastal fisheries too (Fernandez and Vitancurt, 1999). These results seem to be associated with the no inclusion of birds and mammals in the present study.

Most of the species at Rocha Lagoon have a varied diet (they fed on several species or group of species, Table 3), resulting in a complex food web. This fact is characteristic of coastal lagoons which can be considered as very dynamic ecosystems with high ecological resilience in their food webs attributed, in part, to how energy flows through the systems by their complex food web and the eco-physiological adaptations of biological communities to

naturally changing environmental conditions (Day et al., 1989; Hunter and Price, 1992).

To our knowledge, this is the first time this type of approach using fatty acids is used to quantitatively estimate the trophic relationships in a food web. Nevertheless results with these new methodologies should be taken with caution as benthic invertebrates may present some difficulties due to several factors: most taxa lack a specific fat-storage organ; there are not controlled studies of diet of them; and some taxa have great ability to modify dietary FA. However, a cross validation with other methods could yield good results (Kelly and Scheibling, 2012). In the present study the previous issues were taken into account. Preys were analyzed whole –as they are consumed in nature-. There is a tendency to overestimate the prey used in the controlled diet studies (Budge et al., 2012; Magnone et al., 2015), which led us to avoid this type of correction factors. Previous researches with different methodologies in the same study area have been used to cross validated and to discuss the results.

Due to the expressed above we consider that in the present study the application of QFASA resulted in a comprehensive and consistent proposal of trophic web for Rocha Lagoon. The results obtained were consistent with the previous knowledge and provide new data on the functioning of the estuarine ecosystem. Since all methods of diet estimation have limitations and strengths (Pasquaud et al., 2007) consequently some minor results should be taken with care mainly due to the fact that close taxa share common patterns of fatty acids, so the model could mislead some preys. We conclude that it is possible to use the QFASA in the study of trophic webs and we also consider that the results obtained in the present work are a valuable contribution in the understanding of trophic relationships in Rocha Lagoon.

Acknowledgments

We would like to thank the Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA) for providing the facilities during this work. We are grateful to Martín Rocamora for their support during the statistical analyses. We are also grateful to Florencia Féola for the help during the biological sampling. We thank the anonymous reviewers for their supportive comments that helped us in the production of this manuscript. We also thank to COLACMAR organization. We also want to thank the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) for partially funding the development of this research.

References

- Abed-Navandi, D., Dworschak, P.C., 2005. Food sources of tropical thalassinidean shrimps: stable isotope study. Mar. Ecol. Prog. Ser. 291, 159–168.
- Alfaro, C., Thomas, F., Sergent, L., Duxbury, M., 2006. Identification of trophic interactions within an estuarine food web (northern New Zealand) using fatty acid biomarkers and stable isotopes. Estuar. Coast. Shelf Sci. 70, 271–286.
- Alikunhi, N., Narayanasamy, R., Kandasamy, K., 2010. Fatty acids in an estuarine mangrove ecosystem. Rev. Biol. Trop. 58 (2), 577–587.
- Arocena, R., 2007. Effects of submerged aquatic vegetation on macrozoobenthos in a coastal lagoon of the Southwestern Atlantic. Int. Rev. Hydrobiol. 92 (1), 33–47.
- Aubriot, L., Conde, D., Bonilla, S., Hein, V., Britos, A., 2005. Vulnerabilidad de una laguna costera en una Reserva de Biosfera: indicios recientes de eutrofización. In: Vila, I., Pizarro, J. (Eds.), Taller Internacional de Eutrofización de Lagos y Embalses. CYTED XVIIb. Patagonia Impresores, Chile, pp. 65–85.
- Bowen, W., 2000. Reconstruction of pinniped diets: accounting for complete digestion of otoliths and cephalopod beaks. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57, 898–905.
- Bowen, W., Iverson, S., 2013. Methods of estimating marine mammal diets: a review of validation experiments and sources of bias and uncertainty. Mar. Mamm. Sci. 29 (4), 719–754.
- Budge, S.M., Iverson, S.J., Koopman, H.N., 2006. Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: a primer on analysis and interpretation. Mar. Mammal Sci. 22, 759–801.

- Budge, S., Penney, S., Lall, S., 2012. Estimating diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using fatty acid signature analyses: validation with controlled feeding studies. *Can. J. Aquat. Sci.* 69, 1033–1046.
- Budge, S., Springer, A., Iverson, S., Sheffield, G., 2007. Fatty acids biomarkers reveal niche separation in an Arctic benthic food web. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 336, 305–309.
- Callisto, M., Gonçalves Jr., J., Fonseca, J., Petrucio, M., 1998. Macroinvertebrados bentónicos nas lagoas Imboassica, Cabiúnas e Comprida. In: Esteves, F.A. (Ed.), *Ecologia de lagoas costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do município de Macaé (RJ)*. NUPEM/UFRJ, Macaé, pp. 283–298.
- Christie, G., 1982. Lipid Analysis. Pergamon Press, 874 pp.
- Conde, D., Aubriot, L., Sommaruga, R., 2000. Changes in UV penetration associated with marine intrusions and freshwater discharge in a shallow coastal lagoon of the southern Atlantic Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 207, 19–31.
- Coll, M., Librato, S., 2012. Contributions of food web modeling to the ecosystem approach to marine resource management in the Mediterranean Sea. *Fish Fish.* 13, 60–88.
- Dalsgaard, J., St John, M., Kattner, G., Müller-Navarra, D., Hagen, W., 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv. Mar. Biol.* 46, 225–340.
- David, R., 2003. Linking keystone species and functional groups: a new operational definition of the keystone species concept. *Conserv. Ecol.* 7 (1). Response 11.
- Day, W.J., Hall, C.A.S., Kemp, W.M., Yañez-Arancibia, A., 1989. Estuarine Ecology. John Wiley and Sons, Inc., USA, 558 pp.
- De Francesco, C.G., Isla, F.I., 2004. The life cycle and growth of *Heleobia australis* (D'Orbigny, 1835) and *H. conexa* (Gaillard, 1974) (Gastropoda: Rissooidea) in Mar Chiquita Coastal Lagoon (Argentina). *J. Molluscan Stud.* 70, 173–178.
- Dubois, S., Blanchet, H., García, H., Massé, M., Galois, R., Grémare, A., Charlier, K., Guillou, G., Richard, P., Savoye, N., 2014. Trophic resource use by macrozoobenthic primary consumers within a semi-enclosed coastal ecosystem: stable isotope and fatty acid assessment. *J. Sea Res.* 88, 87–99.
- Elliott, M., Hemingway, K., 2002. Fishes in Estuaries. Blackwells, London, 636 pp.
- Elson, T., 2010. Unravelling diet and feeding histories of fish using fatty acids as natural tracer. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 386, 61–68.
- Fabiano, G., Santana, O., Elgue, J.C., 1998. Fish communities in the coastal lagoons of Uruguay. In: Williams, W.D., Sládeková, A. (Eds.), *Verhandlungen International Association of Theoretical and Applied Limnology*. Schweizerbart, Germany, pp. 1439–1441.
- Falk-Petersen, S., Dahl, T., Scott, C., Sargent, J., Gulliksen, B., Kwasniewski, S., Hop, H., Millar, M., 2002. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 227, 187–194.
- Falk-Petersen, S., Hagen, W., Kattner, G., Clarke, A., Sargent, J., 2000. Lipids, trophic relationships, and biodiversity in Arctic and Antarctic krill. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57 (3), 178–191.
- Fernandez, D., Vitancurt, J., 1999. El proceso de salado con maduración de la lacha (*Brevoortia spp.*). Trabajos realizados con pescadores de la laguna de Rocha. Rocha, Uruguay. *Probides. Serie Documentos de Trabajo.* N° 17, 24 pp.
- Figueiredo-Barros, M., Leal, J., Esteves, F., Rocha, A., Bozzelli, R., 2006. Life cycle, secondary production and nutrient stock in *Heleobia australis* (d'Orbigny 1835) (Gastropoda: Hydrobiidae) in a tropical coastal lagoon. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 69, 87–95.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G., 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Giménez, L., Dimitriadis, C., Carranza, A., Borthagaray, A., Rodríguez, M., 2006. Unraveling the complex structure of a benthic community: a multiscale-multianalytical approach to an estuarine sandflat. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 68 (3/4), 462–472.
- Giménez, L., Borthagaray, A., Rodríguez, M., Brazeiro, A., Dimitriadis, C., 2005. Scale-dependent patterns of macrofaunal distribution in soft-sediment intertidal habitats along a large-scale estuarine gradient. *Helgol. Mar. Res.* 59 (3), 224–236.
- Grubaugh, J.W., Wallace, J.B., Houston, E.S., 1997. Production of benthic macroinvertebrate communities along a southern Appalachian river continuum. *Freshw. Biol.* 37, 581–596.
- Hall, D., Lee, S., Meziane, T., 2006. Fatty acids as trophic tracers in an experimental estuarine food chain: tracer transfer. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 336, 42–56.
- Hunter, M.D., Price, P.W., 1992. Playing chutes and ladders: heterogeneity and the relative roles of bottom up and top-down forces in natural communities. *Ecology* 73, 724–732.
- Hyslop, E., 1980. Stomach contents: a review of methods and their application. *J. Fish Biol.* 17 (4), 411–429.
- Iverson, S., 2009. Tracing aquatic food webs using fatty acids: from qualitative indicators to quantitative determination. In: Arts, M.T., Brett, M.T., Kainz, M.J. (Eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer, New York, pp. 281–307.
- Iverson, S.J., Frost, K.J., Lang, S., 2002. Fat content and fatty acid composition of forage fish and invertebrates in Prince William Sound, Alaska: factors contributing to among and within species variability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 241, 161–181.
- Iverson, S., Field, C., Bowen, W., Blanchard, W., 2004. Quantitative fatty acid signature analysis: a new method of estimating predator diets. *Ecol. Monogr.* 74, 211–235.
- John, M., Lund, T., 1996. Lipid biomarkers: linking the utilization of frontal plankton biomass to enhanced condition of juvenile North Sea cod. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131, 75–85.
- Kavanagh, P., Newlands, N., Christensen, V., Paul, D., 2004. Automated parameter optimization for ecopath ecosystem models. *Ecol. Model.* 172, 141–149.
- Kelly, J., Scheibling, R., 2012. Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 446, 1–22.
- Kharlamenko, V.I., Kiyashko, S.I., Imbs, A.B., Vyshkvertzev, D.I., 2001. Identification of food sources of invertebrates from the seagrass *Zostera marina* community using carbon and sulfur isotope ratio and fatty acid analyses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 220, 103–117.
- Léveillé, J., Amblard, C., Bourdier, G., 1997. Fatty acids as specific algal markers in a natural lacustrine phytoplankton. *J. Plankton Res.* 19 (4), 469–490.
- Lillebo, A.I., Pardal, M.A., Marques, J.C., 1999. Population structure, dynamics and production of *Hydrobia ulvae* (Pennant) (Mollusca: Prosobranchia) along an eutrophication gradient in the Mondego estuary (Portugal). *Acta Oecol.* 20 (4), 289–304.
- Magnone, L., Bessonart, M., Rocamora, M., Gadea, J., Salhi, M., 2015. Diet estimation of *Paralichthys orbignyanus* in a coastal lagoon via quantitative fatty acid signature analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 462, 36–49.
- McLusky, D., Elliot, M., 2004. The Estuarine Ecosystem. Ecology, Threats and Management, third ed. Oxford University Press, 214 pp.
- Mianzan, H.W., Lasta, C., Acha, E.M., Guerrero, R., Machi, G., Bremec, C., 2001. The Río de la Plata Estuary, Argentina, Uruguay. In: Seeliger, U., de Lacerda, L.D., Kjerfve, B. (Eds.), *Ecological Studies: Coastal Marine Ecosystems of Latin America*. Springer, Berlin, pp. 185–204.
- Milessi, A., Calliari, D., Rodríguez-Graña, L., Conde, D., Sellanes, J., Rodríguez-Gallego, L., 2010. Trophic mass-balance model of a subtropical coastal lagoon, including a comparison with a stable isotope analysis of the food-web. *Ecol. Model.* 221, 2859–2869.
- Monaco, M., Ulanowicz, R., 1997. Comparative ecosystem trophic structure of three US mid-Atlantic estuaries. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 16, 239–254.
- Napolitano, G.E., 1999. Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems. In: Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds.), *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer, New York, pp. 21–44.
- Norbis, W., Galli, O., 2004. Hábitos de alimentación del lenguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes 1842) en una laguna costera somera del Atlántico Sur: Rocha, Uruguay. *Ciencias Mar.* 30, 619–626.
- Paine, R., 1995. A conversation on refining the concept of keystone species. *Conserv. Biol.* 9 (4), 962–964.
- Paine, R., 1969. A note on trophic complexity and community stability. *Am. Nat.* 103, 91–93.
- Parrish, C.C., Abrajano, T.A., Budge, S.M., Helleur, R.J., Hudson, E.D., Pulchan, K., Ramos, C., 2000. Lipid and phenolic biomarkers in marine ecosystems: analysis and applications. In: Wangersky, P. (Ed.), *The Handbook of Environmental Chemistry*, Part D, Marine Chemistry. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 193–233.
- Pasquaud, S., Lobry, J., Elie, P., 2007. Facing the necessity of describing estuarine ecosystems: a review of food web ecology study techniques. *Hydrobiologia* 588, 159–172.
- Persic, A., Roche, H., Ramade, F., 2004. Stable carbon and nitrogen isotope quantitative structural assessment of dominant species from the Vaccare's Lagoon trophic web (Camargue Biosphere Reserve, France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 60, 261–272.
- Platt, T., Denman, K., 1978. The structure of pelagic marine ecosystems. *Rapports et Procès-Verbaux des Réunions du Conseil International pour l' Exploration de la Mer.* 173, 60–65.
- Prado, P., Vergara, C., Caiola, N., Ibáñez, C., 2014. Influence of salinity regime on the food-web structure and feeding ecology of fish species from Mediterranean coastal lagoons. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 139, 1–10.
- Ramos, C.S., Parrish, C.C., Quibuyen, T.A.O., Abrajano, T.A., 2003. Molecular and carbon isotopic variations in lipids in rapidly settling particles during a spring phytoplankton bloom. *Org. Geochem.* 34, 195–207.
- Richoux, N.B., Deibel, D., Thompson, R.J., Parrish, G.G., 2005. Seasonal and developmental variation in the fatty acid composition of *Mysis mixta* (Mysidacea) and *Acanthostepheia malmgreni* (Amphipoda) from the hyperbenthos of a cold-ocean environment (Conception Bay, Newfoundland). *J. Plankton Res.* 37, 719–733.
- Rodríguez-Graña, L., Calliari, D., Conde, D., Sellanes, J., Urrutia, R., 2008. Food web of a SW Atlantic shallow coastal lagoon: spatial environmental variability does not impose substantial changes in the trophic structure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 362, 69–83.
- Rosen, D., Tollit, D., 2012. Effects of phylogeny and prey type on fatty acid calibration coefficient in three pinniped species: implications for the QFASA dietary quantification technique. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 467, 263–276.
- Rossi, S., Youngbluth, M., Jacoby, C., Pagès, F., Garrofè, X., 2008. Fatty acid trophic markers and trophic links among seston, crustacean zooplankton and the siphonophore *Nanomia cara* in Georges Basin and Oceanographer Canyon (NW Atlantic). *Sci. Mar.* 72 (2), 403–416.
- Rybarczyk, H., Elkaim, B., 2003. An analysis of the trophic network of a macrotidal estuary: the Seine Estuary (Eastern Channel, Normandy, France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 58, 775–791.
- Salhi, M., Bessonart, M., 2013. Growth, survival and fatty acid composition of *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824) larvae fed on artificial diet alone or in combination with *Artemia naupliai*. *Aquac. Res.* 44, 41–79.
- Schiariti, A., Berasategui, A., Giberto, D., Guerrero, R., Acha, A., Mianzan, H., 2006. Living in the front: *Neomysis americana* (Mysidacea) in the Río de la Plata estuary, Argentina-Uruguay. *Mar. Biol.* 149, 483–489.
- Sommaruga, R., Conde, D., 1990. Distribución de la materia orgánica en los sedimentos recientes de la laguna de Rocha (Uruguay). *Atlantica* 12, 35–44.

- Stübing, D., Hagen, W., 2003. On the use of lipid biomarkers in marine food web analyses: an experimental case on study on the Antarctic krill, *Euphausia superba*. Limnol. Oceanogr. 48 (4), 1685–1700.
- Thiemann, G., Iverson, S., Stirling, I., 2008. Polar bear diet and arctic marine food webs: Insights from fatty acids analysis. Ecol. Monogr. 78 (4), 591–613.
- Torres-Ruiz, M., Wehr, J., Perrone, A., 2007. Trophic relations in a stream food web: importance of fatty acids for macroinvertebrate consumers. J. North Am. Benthol. Soc. 26 (3), 509–522.
- Vilas, C., Drake, P., Fockedey, N., 2008. Feeding preferences of estuarine mysids *Neomysis integer* and *Rhopalophtalmus tartessicus* in a temperate estuary (Guadalquivir Estuary, SW Spain). Estuar. Coast. Shelf Sci. 77, 345–356.
- Vitancurt, J., Fagetti, C., 1995. Comunidades de pescadores del departamento de Rocha: informe diagnóstico, recomendaciones y avances para un proyecto de desarrollo Rocha, Uruguay. Probides. Serie Documentos de Trabajo. N° 1, 49 pp.
- Vizziano, D., Forni, F., Saona, G., Norbis, W., 2002. Reproduction of *Micropogonias furnieri* in a shallow temperate coastal lagoon in the Southern Atlantic. J. Fish Biol. 61 (A), 196–206.
- Wang, S., Hollmén, T., Iverson, S., 2010. Validating quantitative fatty acid signature analysis to estimate diets of spectacled and Steller's eiders (*Somateria fischeri* and *Polysticta stelleri*). J. Comp. Physiol. B 180, 125–139.
- Williams, C., Buck, C., 2010. Using fatty acids as dietary tracers in seabird trophic ecology: theory, application and limitations. J. Ornithol. 151 (3), 531–543.
- Young, J., Guest, M., Lansdell, M., Phleger, C., Nichols, P., 2010. Discrimination of prey species of juvenile swordfish *Xiphias gladius* (Linnaeus 1758) using signature fatty acid analyses. Prog. Oceanogr. 86, 139–151.
- Yunping, X., Jaffé, R., 2007. Lipid biomarkers in suspended particles from a subtropical estuary: assessment of seasonal changes in sources and transport of organic matter. Mar. Environ. Res. 64, 666–678.