

# Sobrevivencia y resistencia al estrés en *Prochilodus magdalenae* alimentado con zooplancton y ácido ascórbico\*

*Survival and Stress Resistance in Prochilodus magdalenae Fed with Zooplankton and Ascorbic Acid*

DANNY DANIEL LÓPEZ PATIÑO

Estudiante de Ingeniería Pesquera. Laboratorio de Acuicultura. Programa de Ingeniería Pesquera, Facultad de Ingeniería, Universidad del Magdalena, Colombia  
dannyyandmavis@gmail.com

VIANYS AGUDELO

Ingeniera Pesquera, MSc. Candidata. Laboratorio de Acuicultura. Programa de Ingeniería Pesquera, Facultad de Ingeniería, Universidad del Magdalena, Colombia  
vianysam@gmail.com

ADRIANA RODRÍGUEZ FORERO

Bióloga Marina. MSc., PhD. Laboratorio de Acuicultura. Programa de Ingeniería Pesquera, Facultad de Ingeniería, Universidad del Magdalena, Colombia  
arodriguezf.ingpesquera@gmail.com

## RESUMEN

En la larvicultura de *Prochilodus magdalenae* se presentan mortalidades debido a una deficiente alimentación, al manejo o a enfermedades. La disminución de la mortalidad en un cultivo larvario puede abordarse mediante el empleo de suplementos alimenticios. Este estudio evaluó la sobrevivencia de larvas (15 por acuario), cuando fueron alimentadas con zooplancton y un suplemento de ácido ascórbico (AA), luego de lo cual los animales se sometieron a un choque térmico para estudiar su comportamiento frente a este factor de estrés. Se ofrecieron tres dosis de AA (50 mg, 100 mg y 150 mg) (original y dos réplicas), previamente suministradas a nauplios de *Artemia salina* cultivados en el Laboratorio de Acuicultura de la Universidad del Magdalena. Los resultados se contrastaron con una dieta sin adición de AA. Los animales fueron pesados al inicio y al final del experimento y cada 5 días durante 45 días se monitoreó la supervivencia larvaria. Las larvas sobrevivientes se sometieron a una prueba de estrés térmico para registrar el comportamiento de los animales. Se hizo un análisis de varianza a una vía para

\* Proyecto financiado por el fondo para la investigación de Fonciencias, Universidad del Magdalena, Colombia.

RECIBIDO: 7/10/2012. APROBADO: 27/03/2014

Cómo citar este artículo: López Patiño, D. D., Agudelo, V. y Rodríguez Forero, A. (2014). Sobrevivencia y resistencia al estrés en *Prochilodus magdalenae* alimentado con zooplancton y ácido ascórbico. *Revista Ciencia Animal* (7), 75-84.

analizar los resultados del crecimiento y la sobrevivencia y los datos ante la respuesta térmica se trataron mediante estadística descriptiva. Estos no mostraron diferencias significativas en crecimiento y sobrevivencia entre los tratamientos. Las larvas que consumieron AA tuvieron una mayor resistencia frente al estrés térmico, reflejada en 100% de supervivencia en relación con el tratamiento control, por lo que este micronutriente puede ser suministrado a larvas de *P. magdalenae* para superar condiciones de estrés térmico.

**Palabras clave:** larvicultura, estrés, *Prochilodus magdalenae*, vitamina C.

## ABSTRACT

Mortality in larviculture of *Prochilodus magdalenae* occurs due to poor nutrition, handling or diseases. Decrease in mortality in larval culture can be addressed through use of dietary supplements. This study evaluated larval survival (15 per aquarium), when fed with zooplankton and ascorbic acid (AA), after which the animals were subjected to a thermal shock in order to study their reaction to this stress factor. Three doses of AA (50 mg, 100 mg and 150 mg) (original and two replicas) that had been previously supplied to *Artemia salina* nauplii cultured in the Aquaculture Laboratory of Universidad del Magdalena were offered. The results were compared to a diet without AA. The animals were weighed at the beginning and end of the experiment and larval survival was monitored every 5 days for 45 days. Surviving larvae were subjected to a heat stress test in order to record their behavior. A one-way analysis of variance was made to analyze the growth and survival results and the data from the thermal response were addressed using descriptive statistics. There were no significant differences in growth and survival between treatments. Larvae that consumed AA had a higher resistance to thermal stress, reflected in 100% survival related to the control treatment, reason why this micronutrient can be supplied to *P. magdalenae* larvae in order to overcome heat stress conditions.

**Keywords:** Larviculture, stress, *Prochilodus magdalenae*, vitamin C.

## Introducción

La nutrición de las larvas y las estrategias de alimentación son los principales cuellos de botella para la producción industrial en la acuicultura (Sorgeloos y Léger, 1992). La mayoría de peces tienen una reserva limitada de vitelo y su primera alimentación con dietas vivas sigue siendo un delicado proceso en las granjas comerciales (Kerguelén *et al.*, 2003). *Prochilodus magdalenae* (Steindachner, en 1879) presenta tres periodos críticos de supervivencia durante su desarrollo

larvario: en la primera alimentación, a los 15 días cuando se inicia el desarrollo de la curvatura del aparato digestivo (formación del estómago e inicio de la torsión del tubo digestivo), y al mes cuando empieza a alimentarse del detritus del estanque (De Fex, 1996). Durante esta etapa del desarrollo, las larvas son alimentadas con microalgas, rotíferos y artemias, sin que hasta la fecha se haya desarrollado una dieta específica para la especie que mejore sus indicadores de cultivo y la sobrevivencia.

El éxito de la alimentación con fitoplancton y zooplancton depende de las cepas disponibles, los recursos económicos del productor y las condiciones de cultivo aplicadas, incluidas estrategias de alimentación y mejoras en las prácticas de suministro (Watanabe *et al.*, 1979; Epifanio *et al.*, 1981; Léger *et al.*, 1986; Brown *et al.*, 1998). Actualmente en la larvicultura de *P. magdalenae*, el alimento vivo es esencial y la única dieta durante su desarrollo larvario, por lo que debe ser suministrado adecuadamente con tal de alcanzar un apropiado crecimiento y sobrevivencia, que se verá reflejado posteriormente en la producción de biomasa final (Kerguelén *et al.*, 2003). En este sentido, y de acuerdo con estudios realizados en diferentes especies ícticas, es posible afirmar que la implementación de mejoras en las dietas, como el uso de ácido ascórbico (AA) como micronutriente suplementario, desempeñan un papel importante en procesos fisiológicos de los peces y presentan un efecto benéfico en cuanto a sobrevivencia, inmunidad y respuesta al estrés (Navarre y Halver, 1989; Miyasaki *et al.*, 1995; Verlhac *et al.*, 1996; Ortuño *et al.*, 2001; Sloman *et al.*, 2001; Fracalossi *et al.*, 2001; Chagas *et al.*, 2003; Corredor y Landines, 2009).

El AA o vitamina C se constituye en un micronutriente esencial para la realización de procesos fisiológicos en los

animales, incluyendo los peces (Wilson y Poe, 1973; Lim y Lovell, 1978), y sus requerimientos en estos últimos han sido estudiados desde hace más de 25 años (Chatterjee, 1973; Dabrowski, 1990; Dabrowski, 2001). El Consejo Nacional de Investigación (1993) ha recomendado una concentración de AA entre 25 mg/kg a 50 mg/kg en la dieta de los peces como requisito para asegurar su óptimo crecimiento. Así es que la ausencia de este compuesto o su deficiencia puede causar bajas tasas de eclosión y de eficiencia reproductiva, pobre supervivencia larvaria (Sandnes *et al.*, 1984; Soliman *et al.*, 1986), bajo crecimiento, malformaciones, anormalidades en la pigmentación, respuesta inmune, entre otros (Fracalossi *et al.*, 2001; Dabrowski *et al.*, 2001). El propósito de este estudio es conocer la respuesta de larvas de *Prochilodus magdalenae* sobre la supervivencia y situaciones de estrés térmico cuando fueron alimentadas con dietas vivas suplementadas con AA.

## Material y métodos

Ciento ochenta larvas de *P. magdalenae* de dos días de posteclosión fueron donadas por una granja piscícola de la zona y trasladadas al Laboratorio de Acuicultura de la Universidad del Magdalena donde se aclimataron por 3 días antes del inicio del experimento.

## Monitoreo de las larvas y diseño experimental

Una vez se inició su alimentación exógena, los animales fueron pesados en una balanza analítica marca Ohaus y dispuestos aleatoriamente en 12 recipientes de 3 L de capacidad, llenados a un volumen de 1 L, a razón de 15 larvas/L. Se implementaron 4 tratamientos, cada uno con 3 réplicas. En 3 de ellos se usaron 3 diferentes dosificaciones con AA (marca Merck, 500 mg) pulverizado, y el cuarto tratamiento o control se desarrolló sin adición de AA. Los 4 tratamientos experimentales se enuncian en la tabla 1.

Tabla 1. **Tratamientos experimentales en dietas para larvas de *Prochilodus magdalenae***

TRATAMIENTOS Zooplankton + dosis de AA (mg/ml)
Artemia + 50 AA
Artemia + 100 AA
Artemia + 150 AA
Artemia + control (sin AA)

Fuente: elaboración propia.

## Enriquecimiento de las artemias

Se emplearon artemias de la marca Invime (presentación de Cysts Artemia de 85 % de eclosión). Con 2 días de anterioridad a la puesta en marcha del

experimento, se eclosionaron quistes para obtener nauplios con el tamaño y la cantidad adecuados, los cuales se controlaron a través de la observación con un microscopio de luz (Carl Zeiss Modelo Primo Star). Se realizaron 3 conteos en una cámara Borogov, para luego obtener un promedio del número de nauplios de artemia/ml, que se suministraban 2 veces al día, una en horas de la mañana y otra en horas de la tarde. Las concentraciones oscilaron entre 36 nauplios/ml y 41 nauplios/ml.

## Suplementación con ácido ascórbico

Una vez se obtuvieron nauplios de artemia recién eclosionados, estos fueron enriquecidos con 3 diferentes concentraciones de AA, el cual fue previamente pesado en una balanza analítica. Las dosis se disolvieron en agua dulce y se adicionaron en el cultivo de artemias durante al menos 2 h para que estas lo ingirieran y actuaran como transportadores del suplemento. Luego del enriquecimiento, este fue filtrado para evitar que la cantidad de AA que no fue consumida por las artemias se fijara a las paredes de los recipientes de cultivo y, además, para evitar que la concentración del agua de mar afectara a las larvas. Cuando el proceso estuvo listo, las larvas de *P. magdalenae* fueron alimentadas 2 veces al día, a las 9 a. m. y a las 3 p. m.

## Monitoreo de la calidad de agua

Diariamente se tomaron parámetros físico-químicos como temperatura (°C), pH, oxígeno disuelto (mg/l) con un multiparámetro digital marca Schott® Handylab Multi 12/Set. La dureza del agua se tomó semanalmente con el fin de asegurar una concentración inferior a los 100 mg/L, dado que el agua que surte al Laboratorio de Acuicultura proviene de un pozo profundo. Diariamente se hizo sifoneo y un recambio de agua de 90% para asegurar las mejores condiciones de calidad durante el experimento.

## Sometimiento a estrés

Luego de 45 días de cultivo, las larvas sobrevivientes de los 4 tratamientos estudiados previamente fueron pesadas con una balanza analítica de 0,001 g de precisión (OHAUS Adventurer™), y posteriormente estas fueron sometidas a un proceso de estrés con alta temperatura en el agua. Este ensayo consistió en ubicar las larvas en recipientes con agua a las que se les fue incrementando gradualmente la temperatura desde los 28°C hasta los 36°C, durante un tiempo de 3 h. Para lograr esta temperatura, se emplearon termostatos regulables (Aquarium Heater, HW-200W, HETO). Durante este tiempo se hicieron registros de comportamiento y mortalidad de los animales.

## Análisis estadístico

Los datos de mortalidad larvaria registrados durante el ensayo de alimentación con *Artemia salina* y AA fueron sometidos a un análisis de varianza (Anova) a una vía y se realizó estadística descriptiva para entender el comportamiento de las larvas suplementadas con AA frente a una situación de estrés térmico.

## Resultados

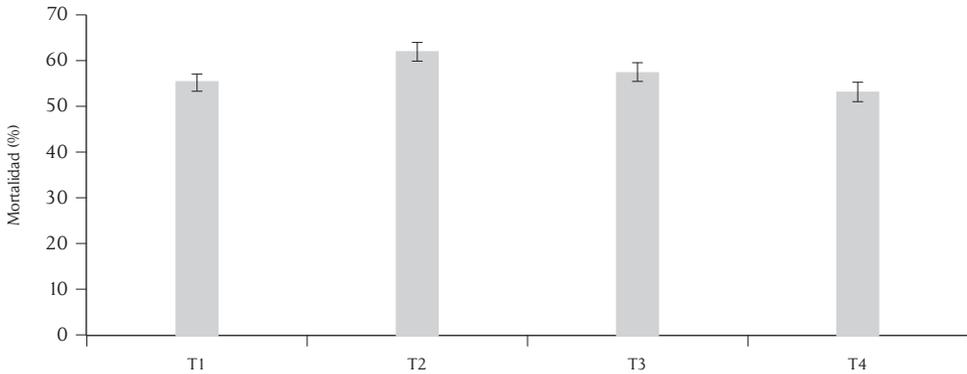
### Comportamiento y sobrevivencia

Durante el experimento, los animales tuvieron un comportamiento normal, con natación lenta, correspondiente con su fase de desarrollo, y presentaron un buen estado de salud. Diariamente se monitoreó la mortalidad de las pequeñas larvas, cuyo resultado se observa en la figura 1. El Anova a una vía demostró que no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto al crecimiento y la mortalidad de los animales.

### Estrés térmico

Una vez las larvas sobrevivientes se sometieron a estrés térmico, se realizaron observaciones de comportamiento y se registró la mortalidad; estos resultados se dan a conocer en la tabla 2.

Figura 1. Porcentaje de mortalidad de larvas de bocachico (*Prochilodus magdalenae*) suplementadas con *Artemia salina* y ácido ascórbico



T1: control; T2: 50 mg AA; T3: 100 mg AA; T4: 50 mg AA.

Fuente: elaboración propia.

Tabla 2. Monitoreo del comportamiento de larvas de *P. magdalenae* sometidas a 36°C de temperatura, en condiciones de laboratorio

Tratamiento	60 min (28 °C)		120 min (32 °C)		180 min (36 °C)	
	S (%)	Observación	S (%)	Observación	S (%)	Observación
T1 (0 mg AA)	100	Los peces nadan normalmente, sin cambio alguno en su comportamiento.	91,67	Nado desesperado distribuido en toda la columna de agua. Se empieza a registrar mortalidad.	80,56	Opérculos abiertos; nado en la superficie y excreción continua. Los peces siguen muriendo.
T2 (50 mg AA)	100	Los peces nadan normalmente, sin cambio alguno en su comportamiento.	100	Nado desesperado distribuido en toda la columna de agua.	100	Movimiento acelerado en los opérculos, tienden a subir a la superficie en busca de oxígeno.
T3 (100 mg AA)	100	Los peces nadan normalmente, sin cambio alguno en su comportamiento.	100	Nado normal, pero los peces tienden a distribuirse en la columna de agua, luego regresan al fondo.	100	Boca y opérculos normales. Nado normal en el fondo del recipiente.
T4 (150 mg AA)	100	Los peces nadan normalmente, sin cambio alguno en su comportamiento.	100	Nado normal en el fondo de los recipientes.	100	Boca y opérculos normales. Nado normal en el fondo del recipiente.

Fuente: elaboración propia.

## Discusión

En este estudio se probaron 3 distintas dosis de AA como suplemento en alimento vivo. En la actualidad, no se conocen resultados similares con la misma especie. Sobre requerimientos específicos de AA, se ha trabajado principalmente en peces juveniles, sobre todo debido a la dificultad de manipular las delicadas larvas que inician su alimentación exógena, como se comprueba en este estudio. Darías *et al.* (2011), en una revisión efectuada sobre los requerimientos de vitaminas D y C, mencionan que los peces tienen necesidades particulares, siendo específicas de cada especie. Los autores muestran diferentes ejemplos relacionados con cantidades de AA (entre 30 mg/kg, 118 mg/kg o 1440 mg/kg) suministradas a peces como barramundi (*Lates calcarifer*), el pez loro (*Oplegnathus fasciatus*) o el pez escalar (*Pterophylum scalare*), sin que ninguna de estas dosis mostrara diferencias en crecimiento, sobrevivencia o malformaciones aparentes en estos animales, teniendo en cuenta que cada una era particularmente diferente. Vale la pena destacar que no existe una dieta elaborada para la acuicultura de *P. magdalenae*. Será necesario realizar nuevos estudios conducentes a identificar la dosis óptima de AA en dietas de esta especie.

Durante el desarrollo larvario y levante de las larvas se observó que, indepen-

dientemente de la dosificación adicional de AA, no existió ninguna diferencia con referencia a los indicadores de crecimiento o sobrevivencia. Por otra parte, el empleo de artemia junto con la suplementación de esta con AA resultó eficiente durante el proceso de estrés térmico al que fueron sometidas las larvas; se observó que a mayor dosificación suministrada, los animales mostraron mayor resistencia a este estresor.

Estos resultados son similares a los reportados por Falahatkar *et al.* (2011), quienes trabajaron con ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), a las que sumergieron en un baño de AA y luego durante su primera alimentación exógena hicieron dos ensayos para alimentarlas con 500 mg/kg de ascorbil fosfato y sin este suplemento, y encontraron que no existieron diferencias entre tratamientos relacionadas con crecimiento y supervivencia. Sin embargo, luego de realizar un nuevo ensayo con larvas suplementadas en su dieta con este micronutriente, mostraron mejores registros en los parámetros de crecimiento y sobrevivencia. Los autores concluyeron que se obtienen mejores resultados en el rendimiento del cultivo cuando los animales son suplementados con AA en su etapa de alimentación exógena.

Como ya se evidenció, en este estudio no hubo diferencias estadísticamente significativas relacionadas con la sobrevivencia.

Así, los resultados del presente estudio difieren de los de Ai *et al.* (2004), quienes enriquecieron una dieta comercial con diferentes niveles de AA para la especie *Lateolabrax japonicus*, y obtuvieron como resultado que a mayor nivel de AA suministrado en la dieta, aumentaba la supervivencia al igual que el tamaño y el peso de los peces. En este trabajo, debido a la delicada condición de las larvas, fue imposible realizar biometrías constantes, pues estas son muy delicadas y débiles y no resisten este tipo de manipulación.

Taati *et al.* (2011) encontraron que larvas *Rutilus frisii kutsum*, cuyas ovas fueron previamente inmersas en cuatro niveles distintos de AA (0, 500, 1000 y 2000 mg L<sup>-1</sup>), mostraron un mejor desempeño ante altos niveles de concentración de amonio (5 mg L<sup>-1</sup>), cuando estas fueron expuestas a la mayor concentración de AA; mientras que Dabrowski *et al.* (2004), en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), encontraron que estas fueron más resistentes a cambios en las concentraciones de oxígeno (hipoxia o hiperoxia) cuando fueron suplementadas con una mayor cantidad de AA (10, 100 y 1000 mg AA/kg), lo cual puede relacionarse con las respuestas de los peces, observadas en este trabajo. Al igual que en este estudio, no se percibieron cambios o diferencias significativas relacionadas con la mortalidad entre tratamientos.

## Conclusión

En este trabajo se encontró que las larvas de *Prochilodus magdalenae* recién eclosionadas y alimentadas con *Artemia salina* y suplemento de AA no muestran diferencias en los indicadores de crecimiento o mortalidad, comparadas con aquellas no suplementadas con este micronutriente. Sin embargo, cuando estas son sometidas a una condición de estrés térmico, los indicadores de supervivencia mejoran efectivamente. Lo anterior indica que no es necesario que el acuicultor suplemente con este micronutriente a las pequeñas larvas pues, el hacerlo, aumentará los costos de producción y no incrementará su tasa de supervivencia; sin embargo, el suplemento será eficiente en casos de estrés térmico.

## Referencias

- Ai, Q., Mai, K., Zhang, C., Xu, W., Duan, O., Tan, B., y Liufu, Z. (2004). Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture*, 242, 489-500.
- Brown, M. R., Skabo, S., y Wilkinson, B. (1998). The enrichment and retention of ascorbic acid in rotifers fed microalgal diets. *Aquaculture Nutrition*, 4, 151-156.
- Chagas, E. C., Mesquita-Saade, L. F. B., Aride, T. H. R., Mendes, F. A., Almeida-Val, V. M. F. y Val, A. L. (2003). Vitamins C, D and E in fish. In A. L. Val y B. G.

- Kapoor (Eds.), *Fish Adaptation* (pp. 141-178). United States: Science Publishers.
- Chatterjee, L. B. (1973). Evolution and biosynthesis of ascorbic acid. *Science*, 182, 1271-1272.
- Corredor, A. S. y Landines, M. A. (2009). Efecto del ácido ascórbico sobre la respuesta de los peces ante condiciones de estrés. *Rev. Med. Vet. Zoot.*, 56, 53-66.
- Dabrowski, K. (1990). Ascorbic acid status in the early life of whitefish (*Coregonus laaaretus* L.). *Aquaculture*, 84, 61-70.
- Dabrowski, K. (2001). History, present and future of ascorbic acid research in aquatic organism. In K. Dabrowski (Ed.), *Ascorbic acid in aquatic Organisms-Status and Perspectives* (255-277). Boca Ratón: CRC Press.
- Dabrowski, K., Lee, K. J., Guz, L., Verlhac, V. y Gabaudan, J. (2004). Effects of dietary ascorbic acid on oxygen stress (hypoxia or hyperoxia) growth and tissue vitamin concentrations in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 233, 383-392.
- Darias, M. J., Mazurais, D., Koumoundouros, G., Cahu, C. L. y Zambonino-Infante, J. L. (2011). Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence on the skeletal system. *Aquaculture*, 315, 49-60.
- De Fex, De S. R. (8-11 de mayo de 1996). *Experiencias obtenidas con bocachico (Prochilodus magdalenae)* (pp. 77-84). Curso y Seminario Internacional de Acuicultura, 1. Memorias, Santa Marta.
- Epifanio, C. E., Valenti, C. C. y Turk, C. L. (1981). A comparison of *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana* as food for the oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, 23, 347-353.
- Falahatkar, B., Dabrowski, K. y Arslan, M. (2011). Ascorbic acid turnover in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Is there a vitamin enrichment effect during embryonic period on the juvenile fish "sensitivity" to deficiency? *Aquaculture*, 320, 99-105.
- Fracalossi, D., Allen, M., Yuyama, L. K. y Oftedal, O. T. (2001). Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. *Aquaculture*, 192, 321-32.
- Kerguelén, E., Sánchez, I. y Atencio, V. (2003). *Influencia de la presa en la primera alimentación del bocachico (Prochilodus magdalenae Steindachner, 1878)* (pp. 295-302). Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura-CIVA, 2. Recuperado de <http://www.civa2003.org>
- Léger, Ph., Bengtson, D. A., Simpson, K. L. y Sorgeloos P. (1986). The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 24, 521-623.
- Lim, C. y Lovell, R. T. (1978). Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.*, 108, 1137-1146.
- Miyasaki, T., Sato, M. y Yoshinak, R. (1995). Effect of 24 vitamin C on lipid and carnitine metabolism in rainbow trout. *Fish. Sci.*, 61, 501-506.

- National Research Council. (1993). *Nutrient requirements of fish*. Washington D. C.: National Academy Press.
- Navarre, O. y Halver, J. E. (1989). Disease resistance and humoral anti-body production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, 79, 207-219.
- Ortuño, J., Cuesta, A., Esteban, M. A. y Meseguer, J. (2001). Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 79, 167-180.
- Sandnes, K., Ulgenes, Y., Braekken, O. R. y Utne, F. (1984). The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 43, 167-177.
- Sloman K. A., Taylor, A. C., Metcalfe, N. B. y Gilmour, K. M. (2001). Stress from air emersion fails to alter chloride cell numbers in the gills of rainbow trout. *J. Fish Biol*, 59, 186-190.
- Soliman, A. K., Jauncey, K. y Roberts, R. J. (1986). The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, 59, 197-208.
- Sorgeloos, P. y Léger, Ph. (1992). Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. *J. World Aquacult. Soc.*, 23, 251-264.
- Taati, M., Jafaryan, H. y Mehrad, B. (2011). Evaluated the influence of ascorbic acid on hatching performance and tolerance against high ammonia concentration by immersion of kutum (*Rutilus frisii kutum*) fertilized eggs. *Austral. Journ. Bas. Appl. Scienc.*, 5(7), 153-158.
- Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schüep, W. y Hole, R. (1996). Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 143, 123-133.
- Watanabe, T., Oowa, F., Kitajima, C., Fujita, S. y Yone, Y. (1979). Relationship between the dietary value of rotifers *Brachionus plicatilis* and their content of w3 highly unsaturated fatty acids. *Bull. Jpn. Sot. Sci. Fish.*, 45, 883-889.
- Wilson, R. P. y Poe, W. E. (1973). Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. *J. Nutrition*, 103, 1359-1364.
- Xie, Z., Niu, C., Zhang, Z. y Bao, L. (2006). Dietary ascorbic acid may be necessary for enhancing the immune response in *Siberian sturgeon* (*Acipenser baerii*), a species capable of ascorbic acid biosynthesis. *Comp. Bioch. Phys.*, Part A(145), 152-157.