



Investigación e Innovación en Nutrición Acuicola

*L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie,
Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David
A. Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado,
Carlos A. Martínez Palacios*

Investigación e Innovación en Nutrición Acuícola
2022, Monterrey, Nuevo León, México

Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado y Carlos A. Martínez Palacios.

Programa Maricultura
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León 2022

Copias disponibles en:
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa Maricultura
Cd. Universitaria
San Nicolás de los Garza, Nuevo León
C.P. 66455
Tel.+Fax. 818352 6380
E-mail: lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

Para citar alguna parte de ésta obra siga el siguiente estilo:

- Autores del escrito. 2022. Nombre del artículo. Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado y Carlos A. Martínez Palacios. Investigación e innovación en nutrición acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.473 ISBN: 978-607-27-1732-9. El cuidado de la presente edición, así como su realización estuvo a cargo de los editores.

La reproducción total o parcial de ésta obra requiere la autorización escrita por los titulares del derecho de autor.

Los editores hacemos extensivo nuestro profundo agradecimiento:

- A las personas que colaboraron en la edición técnica de estas memorias

Directorio

Dr. Santos Guzmán López
Rector

Dr. Juan Paura García
Secretario. General

Dr. Celso José Garza Acuña
Secretario extensión y cultura

Lic. Antonio Ramos Revillas
Director de Editorial Universitaria

Dr. José Ignacio González Rojas
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas

Editores

Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, y Carlos A. Martínez Palacios.

Dirección de edición: Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Av. Universidad S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66455
Email: elicruz@hotmail.com, lucia.cruzsr@uanl.edu.mx
Teléfonos: 52 8183526380

Primera edición 2022. ©Universidad Autónoma de Nuevo León. ©L. Elizabeth Cruz Suárez, ©Mireya Tapia Salazar, ©Martha Guadalupe Nieto López, ©David Alonso Villarreal Cavazos, ©Julián Gamboa Delgado, ©Carlos A. Martínez Palacios.

ISBN:978-607-27-1732-9. El cuidado y edición estuvo a cargo de los editores. El contenido es responsabilidad de los autores.

Párrafo legal: Reservado todos los derechos conforme a la ley. Prohibida la reproducción total o parcial de la obra sin previa autorización por escrito del titular propietario y editor de la obra.

Índice

Dr. Albert Tacon (<i>Aquahana LLC, Hawaii, USA</i>) El papel de la nutrición de peces en la mejoría de la salud humana y la seguridad mundial The role of fish nutrition in improving human health and global food security.	7
Oscar Monroig (<i>Instituto de Acuicultura Torre de la Sal, España</i>); Últimos avances en el estudio de la biosíntesis de ácidos grasos omega-3 de cadena larga en invertebrados acuáticos. Latest advances in the study of the biosynthesis of long-chain omega 3 fatty acids in aquatic invertebrates.	25
David Celdrán Sabater (<i>Bioaquafloc, Costa Rica</i>); Acuicultura Simbiótica como nueva técnica productiva. Symbiotic aquaculture as a new productive technique of Bioaquafloc.	28
Joseph Selvin (<i>University of Pondicherry, India</i>); Application of Poly- β -hydroxybutyrate in Shrimp Health Management. Aplicación de poli- β -hydroxybutyrato en el manejo de la salud del camarón.	35
Emmanuel Martínez (<i>Universidad Politécnica de Sinaloa, México</i>); Proteínas y Péptidos de Residuos Líquidos Pesqueros: Obtención, Bioactividad y Uso en la Alimentación Acuícola. Proteins and peptides from liquid fishery residues: obtention, bioactivity and its us in aquaculture feed.	50
Eduardo Quiroz (<i>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S. México</i>); Bacteriófagos: Herramientas de Control Biológico para una Acuicultura Sostenible. Bacteriophages: biological control tools for a sustainable aquaculture.	71
Helene Volkoff (<i>University of Newfoundland, Canada</i>); Effects of nutritional status and environmental factors on the endocrine regulation of feeding in freshwater fish. Efectos del estado nutricional y factores ambientales sobre la regulación endocrina de la alimentación en peces teleósteos de agua dulce seleccionados.	113
Francisco J. Toledo S. (<i>Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, México</i>); El titarro (<i>Lathyrus cicera</i> L.) como una alternativa sustentable para el remplazo de harina de soya en alimentos de <i>Oncorhynchus mykiss</i> . Titarro (<i>Lathyrus cicera</i> L.) as a sustainable alternative to replace soybean meal in <i>Oncorhynchus mykiss</i> feeds.	118
Madison Powell (<i>University of Idaho, USA</i>); Correlation of expression and enzyme activity among stress-related genes in Salmonids. Correlación de expresión y actividad enzimática entre genes relacionados con el estrés en salmónidos.	137
Vikas Kumar (<i>University of Idaho, India</i>); Nutrigenomic approaches improve the efficiency of soybean meal utilization in salmonids Aquaculture. Nutrigenomic approaches improve the efficiency of soybean meal utilization in salmonids aquaculture.	156

Yutaka Haga (<i>Tokyo University of Marine Science and Technology, Japón</i>); Effect of taurine precursor on growth and taurine content of marine fish. Efecto del precursor de taurine sobre el crecimiento y contenido de taurina en peces marinos.	158
Francisco Javier Alarcón (<i>Universidad de Almería, España</i>); Develando el potencial de las algas para la elaboración de piensos para peces de acuicultura. Unveiling the potential of algae for the production of feed for aquaculture fish.	176
Crisantema Hernandez (<i>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán, México</i>); Estrategias Nutricionales y Productos de soya para la Alimentación de Juveniles de Róbalo blanco del pacífico (<i>Centropomus viridis</i>): hacia la Rentabilidad de su Cultivo Nutritional Strategies and Soy Products for the Feeding of Juvenile Pacific White Bass (<i>Centropomus viridis</i>): Towards the Profitability of its Cultivation	217
Ángel Campa (<i>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México</i>); Bacteria and microalgae interaction on rearing Kumamoto oyster <i>Crassostrea sikamea</i> spat / Interacción bacteria microalga en el cultivo de semilla del ostión Kumamoto <i>Crassostrea sikamea</i> .	223
Luis Martínez (<i>Universidad de Sonora, México</i>); Alternativas de acuicultura sostenible: aspectos nutricionales. Sustainable aquaculture alternatives: nutritional aspects.	245
Martín Arenas (<i>Universidad Nacional Autónoma de México, UMDI Sisal, México</i>); Avances en la nutrición de <i>Centropomus undecimalis</i> . Advances in the nutrition of <i>Centropomus undecimalis</i> ..	263
Luis Hernández (<i>Universidad Nacional Autónoma de México, FES Iztacala, México</i>); Avances en nutrición del langostino <i>Macrobrachium acanthurus</i> . Advances in nutrition of the shrimp <i>Macrobrachium acanthurus</i> .	284
Alberto Peña (<i>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S. México</i>); Valorización de macroalgas para su uso como alimento acuícola. Valorization of macroalgae for use as aquaculture feed.	294
Grecia Montalvo (<i>Universidad Nacional Autónoma de México, UMDI Sisal, México</i>); Respuesta antioxidante y del sistema inmune de machos reproductores de <i>Litopenaeus vannamei</i> Boone (1931) alimentados con dietas suplementadas con vitamina E. Antioxidant and immune system response of breeding male <i>Litopenaeus vannamei</i> Boone (1931) fed diets supplemented with vitamina E.	316
Omar Mendoza (<i>Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, CSIRO Australia</i>), Development of high-throughput omics resources for aquaculture nutrition. Desarrollo de recursos ómicos de alto rendimiento para la nutrición acuícola.	343

<p>Artur Rombenso (<i>Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, CSIRO Australia</i>); Aquaculture nutrition research at CSIRO: Maintaining productivity and competitiveness in challenging times. Aquaculture nutrition research at CSIRO: Maintaining productivity and competitiveness in challenging times.</p>	361
<p>Claudia Maytorena (<i>Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México</i>); Efecto de manano-oligosacáridos en el crecimiento, actividad de enzimas digestivas y expresión de genes relacionados a la mucosa intestinal de larvas de pejelagarto <i>Atractosteus tropicus</i>. Effect of mannan-oligosaccharides on growth, digestive enzymes activity, and expression of genes related to the intestinal mucosa of <i>Atractosteus tropicus</i> larvae.</p>	394
<p>Addison Lawrence (<i>Texas A&M University, Texas A&M AgriLife Research, USA</i>); Review of bacterial and yeast base single cell protein ingredients as attractants and fish meal replacements in diets for <i>Litopenaeus vannamei</i>. Revisión de ingredientes de proteínas unicelulares con base en bacterias y levaduras como atrayentes y reemplazos de harina de pescado en dietas para <i>Litopenaeus vannamei</i>.</p>	413
<p>Marcelo Tesser (<i>Universidade Federal do Rio Grande-FURG Brasil</i>); Uso de Alimentos no Convencionales en Acuicultura: Estudios Realizados em la Universidad Federal De Rio Grande -FURG. Use of non-conventional feeds in aquaculture: Studies carried out at the Federal University of Rio Grande-FURG.</p>	415
<p>Andressa Teles (<i>Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México</i>); Bioencapsulación de levadura probiótica para larvas de <i>Seriola rivoliana</i>. Bioencapsulation of probiotic yeast for <i>Seriola rivoliana</i> larvae.</p>	432
<p>Carmen Monroy (<i>Universidad Autónoma Metropolitana, México</i>); Alimentos funcionales y su aplicación en organismos acuáticos. Functional foods and their application in aquatic organisms.</p>	455
<p>María Celia Portella (<i>São Paulo State University, Brasil</i>); FLOCponics: The integration of biofloc technology with plant production and the possibility to reduce the protein level of tilapia juveniles diet. La integración de la tecnología biofloc con la producción de plantas y la posibilidad de reducir el nivel de proteína en la dieta de juveniles de tilapia.</p>	472

The Role of Fish Nutrition in Improving Human Health and Global Food Security

Albert G.J. Tacon^a & Daniel Lemos^b

^a Aquahana LLC, Honolulu, Hawaii, USA agjtacon@aol.com

^b Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, São Paulo, Brazil,

E-mail: dellemos@usp.br

Abstract

Malnutrition represents the world's greatest preventable health challenge, including both undernutrition and overnutrition. The role play by fish and seafood in global food supply and within the Americas is discussed, with aquatic food products offering a much healthier alternative to farmed terrestrial meat products. The paper highlights the important role played by fish nutrition in the formulation of fish and shrimp feeds, and in particular for the nutritional enhancement of farmed fish products through dietary fortification with essential nutrients and improved health attributes,

Keywords: *malnutrition, aquaculture, food supply, human health, nutrient fortification*

The double burden of malnutrition

Malnutrition represents the world's greatest preventable health challenge; the term malnutrition covering both undernutrition (which includes wasting [low weight-for-height], stunting [low height-for-age], underweight [low weight-for age], and vitamin and mineral deficiencies) and overnutrition (which includes overweight, obesity and diet related noncommunicable diseases [NCDs] such as heart disease, hypertension and stroke, diabetes and some cancers).

According to the World Health Organization nearly one in three persons globally suffers from at least one form of malnutrition, with over 1.9 billion adults being overweight or obese (WHO, 2017; 2021a) and 928 million people suffering from severe food insecurity; over half of the world's undernourished living in Asia (418 million) and over a third in Africa (282 million; FAO *et al.*, 2021). Globally, an estimated 155 million children under the age of 5 years are suffer from stunting, while 41 million are overweight, and with around 45% of all deaths among children under 5 years of age being linked to undernutrition (WHO, 2021a).

In contrast to undernutrition, which is mainly linked to low income and poverty, the rapid rise of obesity and diet related NCDs within developed and developing countries has mainly resulted from the increased consumption of lower-cost processed fast foods and high energy-dense diets, coupled with a more sedentary life style (FAO, 2021a; FAO *et al.*, 2021; Tacon *et al.*, 2020; WHO, 2017, 2021a).

Role of fish in global food supply and within the Americas

Although oceans and freshwaters cover more than 71% of our planet, aquatic food products¹ represented less than 3.25 % of total global food supply in 2018 (171.44 million tonnes, live weight equivalent basis), and supplied 108.65 million tonnes of aquatic meat products to the global food basket (FAO, 2021a). Moreover, in terms of nutrient supply, fish and seafood supplied 6.8% of total animal calorific supply, 16.9% of total animal protein supply and 3.2% of total animal fat supply on a global basis in 2018; freshwater fish supplying over 42.9% of total fish and seafood animal protein supply, followed by pelagic fish (20.0%), demersal fish (15.0%), crustaceans (9.1%), other marine fish (5.9%), cephalopods (3.2%), other molluscs (3.2%) and other aquatic animals (0.36%; Table 1, FAO, 2021a).

¹ Includes wild and farmed fish and seafood, including crustaceans, molluscs (including cephalopods), other invertebrate aquatic animals, and aquatic plants;

Table 1. Contribution of fish & aquatic animal products to animal food supply by major geographic region in 2018 (FAO, 2021a)

Region	Total fish food supply 1000 tonnes	Total fish food supply kg/cap/yr	Plant/animal food supply kcal/cap/dy	Food fish supply kcal/cap/dy	Fish protein supply ⁶ g/cap/dy	Fish fat supply g/cap/dy
Asia	108,296 (71.4%)	23.95	2,373/476	40 (8.40%)	6.46 (22.7%)	1.33 (3.79%)
Africa	11,718 (7.7%)	10.27	2,403/200	19 (9.50%)	3.04 (20.0%)	0.70 (5.39%)
Europe	15,997 (10.5%)	21.39	2,436/948	46 (4.85%)	6.48 (11.1%)	1.99 (2.82%)
Oceania	865 (0.57%)	26.75	2,325/981	44 (4.48%)	6.73 (10.4%)	1.60 (2.23%)
Central America	2,111 (1.4%)	12.03	2,409/612	24 (3.92%)	3.66 (9.23%)	0.83 (1.89%)
^a Northern America	8,081 (5.3%)	22.19	2,747/1,013	36 (3.55%)	5.42 (7.55%)	1.29 (1.82%)
^b South America	4,112 (2.7%)	9.71	2,350/734	17 (2.32%)	2.75 (5.79%)	0.62 (1.18%)
^c World	151,641	20.37	2,402/527	36 (6.8%)	5.59 (16.9%)	1.24 (3.25%)

^a Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Mexico, Nicaragua, Panama

^b Canada, USA

^c Argentina, Bolivia, Brazil, Chile, Colombia, Ecuador, Guyana, Paraguay, Peru, Suriname, Uruguay, Venezuela

Regionally, the Asian region produced over 71.4% of total global food fish production in 2018, followed by Europe (10.5% by weight), Africa (7.7%), Northern America (5.3%), South America (2.7%), Central America (1.4%), and Oceania, respectively (0.57%; Table 1). However, in contrast to the Asian region where fish and seafood supply is mainly derived from increased aquaculture production (the Asian region producing over 110.03 million tonnes or 91.6% of total global aquaculture production in 2019; FAO, 2021b), fish and seafood supply within the other regions is still largely sourced from wild capture fisheries (FAO, 2020).

In terms of nutrient supply, the highest contribution of fish and seafood products to total nutrient supply was in the Asian region (22.7% of total animal protein supply, 3.79% of total animal fat supply, and 8.40% of total animal calorific supply), followed by the African region (20.0% of total animal protein supply, 5.39% of total animal fat supply, and 9.5% of total calorific supply; Table 1). By contrast, despite a high per capita fish and seafood supply within Oceania (26.75 kg/cap/year), Northern America (22.19 kg/cap/year), and Europe (21.39 kg/cap/year), fish and seafood supplied only 10.4% of total animal protein supply and 2.23% of animal fat supply in Oceania, 7.55% of total animal protein supply and 1.82% of animal fat supply in Northern America, and 11.1% of total animal protein supply and 2.82% of animal fat supply in Europe (Table 1).

By contrast, the lowest contribution of fish and seafood to nutrient supply was in South America (2.32%, 5.79% and 1.18% of total energy, protein and fat supply, respectively), followed by Northern America (3.55%, 7.55% and 1.82% of total energy, protein and fat supply, respectively) and Central America (3.92%, 9.23% and 1.89% of total energy, protein and fat supply, respectively; Table 1). On a country basis, fish and seafood supply in the region varied from a low of 0.9%, 2.1% and 0.5% of total energy, protein and fat supply in Bolivia, to a high of 14.2%, 24.1% and 9.9% of total energy, protein and fat supply in Peru, respectively (Table 2).

Moreover, within most countries where fish and seafood currently play a minor role in animal protein supply (supplying <10% of animal protein supply) there is a general over consumption of energy rich terrestrial animal food products, processed foods, and high energy beverages (sugars and sweeteners supplying over 10% of total calorific supply; Figure 1; Table 2). As a consequence of these dietary food choices it is perhaps not surprising therefore that obesity, heart diseases and diabetes and NCDs have emerged as a major health risk and cause of death within most countries within the region, including Brazil, Mexico and the USA (Tacon *et al.*, 2020; Cameron *et al.*, 2021; Ferreira *et al.*, 2021; Global Obesity Observatory, 2021; Lawrence *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021; World Bank, 2021b; Fig. 2).

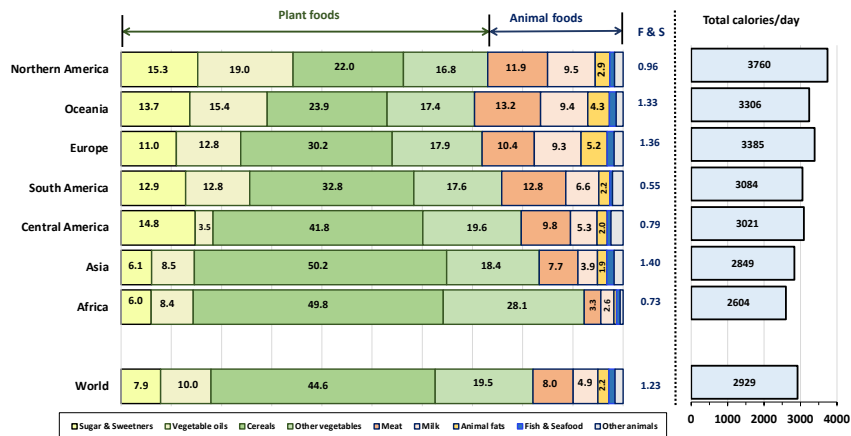


Figure 1. Contribution of the major food groups to total food supply by region (values expressed as % total calorie supply; FAO, 2021a)

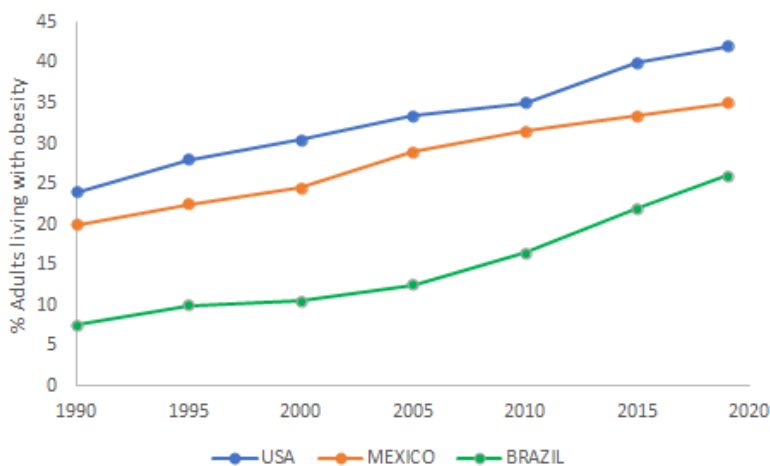


Figure 2. Adult obesity 1990-2019 (%) in the United States, Mexico and Brazil. Data source: Global Obesity Observatory (<http://data.worldobesity.org>). Brazil data 2015 and 2019 are author’s estimates and also based on Silva *et al.* (2021).

Table 2. Contribution of fish and seafood to food supply within countries within the Americas
(contribution of fish and seafood toward nutrient supply expressed as %; FAO, 2021a)

Country	Total food supply per capita per day						Fish & seafood food supply/capita/day		
	Total calories (kcal)	Animal calories (kcal)	Animal protein (g)	Animal fat (g)	Sugar & sweeteners ¹ (kcal)	Calories	Protein g	Fat g	
Venezuela	2,210	347 (5.8%)	24.57 (12.2%)	24.30 (3.0%)	256 (12.1%)	20	2.99	0.74	
Bolivia	2,412	544 (0.9%)	35.46 (2.1%)	40.97 (0.5%)	308 (12.8%)	5	0.75	0.21	
Guatemala	2,551	289 (2.1%)	21.75 (4.6%)	19.12 (1.1%)	487 (19.1%)	6	1.00	0.21	
Nicaragua	2,582	304 (3.6%)	19.66 (7.8%)	20.59 (2.2%)	407 (15.8%)	11	1.53	0.46	
Ecuador	2,606	535 (2.6%)	30.73 (7.7%)	40.7 (1.2%)	207 (7.9%)	14	2.36	0.49	
Honduras	2,673	344 (1.4%)	21.94 (3.5%)	23.28 (1.0%)	446 (16.7%)	5	0.76	0.24	
El Salvador	2,696	439 (3.4%)	26.91 (8.1%)	30.89 (1.8%)	413 (15.3%)	15	2.19	0.57	
Suriname	2,698	327 (10.1%)	24.71 (19.3%)	22.30 (5.8%)	402 (14.9%)	33	4.78	1.30	
Paraguay	2,768	387 (2.1%)	28.08 (4.4%)	26.16 (1.2%)	286 (10.3%)	8	1.23	0.31	
Peru	2,775	339 (14.2%)	29.78 (24.1%)	19.2 (9.9%)	222 (8.0%)	48	7.18	1.91	
Panama	2,851	619 (5.8%)	42.74 (12.0%)	42.93 (3.5%)	341 (12.0%)	36	5.13	1.49	
Guyana	2,913	470 (8.7%)	35.54 (19.7%)	27.47 (3.8%)	317 (10.9%)	41	7.01	1.05	
Costa Rica	3,029	697 (6.2%)	45.97 (12.5%)	45.53 (4.4%)	503 (16.6%)	43	5.73	2.00	
Chile	3,029	809 (3.0%)	49.6 (7.2%)	62.54 (1.4%)	444 (14.6%)	24	3.56	0.91	
Colombia	3,114	545 (2.6%)	37.31 (5.5%)	37.02 (1.6%)	590 (18.9%)	14	2.05	0.59	
Mexico	3,157	697 (3.9%)	44.78 (9.6%)	50.68 (1.8%)	445 (14.1%)	27	4.30	0.92	
Uruguay	3,202	801 (2.2%)	46.22 (5.7%)	58.48 (1.2%)	477 (14.9%)	18	2.64	0.72	
Brazil	3,301	860 (1.7%)	53.77 (4.5%)	61.44 (0.7%)	409 (12.4%)	15	2.45	0.46	
Argentina	3,307	1,043 (1.2%)	69.05 (3.0%)	76.34 (0.5%)	453 (13.7%)	13	2.08	0.39	
Canada	3,566	888 (4.0%)	56.75 (9.9%)	68.89 (1.8%)	447 (12.5%)	36	5.63	1.22	
USA	3,782	1,027 (3.5%)	73.46 (7.3%)	71.18 (1.8%)	589 (15.6%)	36	5.40	1.30	

¹ Expressed as percent total calories

Fish and seafood – a healthier alternative to terrestrial meat products

Aquatic food products offer a much healthier food source than terrestrial meat products in the global fight against malnutrition and obesity; aquatic animal foods (whether captured or cultured) having a higher protein content on an edible weight basis than most terrestrial meats, a lower caloric density and generally being much leaner than red and processed meats, having the highest content of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids than any other animal foodstuff, and generally having a higher mineral and vitamin content than most terrestrial meats and processed meat products (Reames 2012; Sargent & Tacon, 1999; Tacon and Metian 2013; USDA, 2018). Moreover, considerable scientific data exists concerning the direct health benefits of consuming aquatic food products, either through the reduced risk of death from coronary heart disease and stroke, the reduced risk of diabetes, the increased duration of gestation and improved visual and cognitive development, the improved neurodevelopment in infants and children when fish is consumed before and during pregnancy, and the reduced risk of thyroid cancer in women through seaweed consumption (FAO/WHO, 2011; Forouhi *et al.*, 2018; He, 2009; Hellberg *et al.*, 2012; Michikawa *et al.*, 2012; Verbeke *et al.*, 2005; Wallin *et al.*, 2012).

Despite the above nutritional and health attributes, there are potential health risks from the consumption of aquatic food products. These can include specific health risks from the consumption of raw/under-cooked fish or shellfish (contaminated with live pathogens or parasites; FAO/WHO, 2011; Hellberg *et al.*, 2012) or from the consumption of aquatic food products sourced from polluted waters (contaminated with environmental pollutants such as heavy metals, persistent organic pollutants [POPs], veterinary drug residues, or micro-plastics; Barber *et al.* 2006; Domingo *et al.* 2007; Lie, 2008; Nicklisch *et al.* 2017; Schmid *et al.* 2007; Tacon & Metain, 2008; Verbeke *et al.* 2005; VKM, 2014; Weber & Goerke, 2003; Xanthos & Walker, 2017) or from the consumption of fish and shellfish sourced from waters containing algal biotoxins (Morabito *et al.* 2018). However, in most instances these risks can be eliminated or greatly reduced by the use of appropriate cooking, handling and/or processing techniques, or through the selection of wild aquatic food products from unpolluted waters. Notwithstanding the above risks, it is generally believed that the higher nutritional value and potential health benefits derived from increased fish consumption far out-way the potential negative risks to human health (FAO/WHO, 2011; VKM, 2014).

Role of fish nutrition in improving human health

It follows from the above discussion that wild-caught fish and seafood products have a greater risk of being contaminated with environmental pollutants and algal biotoxins than farmed aquatic species, where strict controls are usually placed on feed quality and food safety (Barber *et al.*, 2006; Escher *et al.*, 2020; Kwasek *et al.*, 2020; Lie, 2008; Maule *et al.*, 2007; Nicklisch *et al.*, 2017; Schmid *et al.*, 2007; Tacon & Metian, 2008, 2013; USDA, 2018; VKM, 2014; Weber & Goerke, 2003).

In view of the potential presence of environmental pollutants within wild-caught fish and the global stagnation of capture fisheries landings (FAO 2021b), it is clear that aquaculture is the only real long-term sustainable solution for increased fish and seafood production in the short or long term (Tacon, 2020). Moreover, in the case of aquaculture (in contrast to wild capture fisheries), it is also possible to enhance the nutritional profile of the flesh of the cultured by dietary manipulation and/or dietary fortification to meet potential consumer needs (Lie, 2008; Tacon *et al.*, 2020).

Examples of research studies which have successfully demonstrated the nutritional enhancement of farmed fish through dietary fortification are numerous (Figure 2), and examples can be listed as follows:

- Dietary fortification with long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids, including Atlantic salmon *Salmo salar* (Kousoulaki *et al.*, 2016; Lie 2008; Nanton *et al.*, 2012; Sprague *et al.*, 2016; Rosenlund *et al.*, 2011; Torstensen *et al.*, 2004), Channel catfish *Ictalurus punctatus* (Manning *et al.*, 2006; Manning *et al.*, 2007), Tilapia *Oreochromis* sp. (Jiratanan 2007; Jorge *et al.*, 2021; Ng *et al.*, 2013; Petenuci *et al.*, 2018; Sarker *et al.*, 2016; Stoneham *et al.*, 2018; Watters *et al.*, 2013) and shrimp *Litopenaeus vannamei* (Kumar *et al.*, 2018; Nonwachai *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015);
- Dietary fortification with fat soluble vitamins, including vitamin E: Atlantic salmon *S. salar* (Harare *et al.*, 1998; Sigurgisladottir *et al.*, 1994; Waagbø *et al.*, 1993), Rainbow trout *O. mykiss* (Mihalca *et al.*, 2011);
- Dietary fortification with essential trace minerals, including 1) Selenium: African catfish *Clarias gariepinus* (Luten *et al.*, 2008; Schram *et al.*, 2008), Atlantic salmon *S. salar* (Berntssen *et al.*, 2018; Lorentzen *et al.*, 1994; Sele *et al.*, 2018), common carp and gilthead seabream (Barbosa *et al.*, 2020), Rainbow trout *O. mykiss* (Ribeiro *et al.*, 2017); 2) Iodine, including Atlantic salmon *S. salar* (Julshamn *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2003), Chars *Salvelinus* sp. (Schmid *et al.*, 2003),

common carp and gilthead seabream (Barbosa *et al.*, 2020), Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Ribeiro *et al.*, 2017); and 3) trivalent Chromium: Nile Tilapia *O. niloticus* (Li *et al.*, 2018); and

- Dietary fortification with essential and non-essential amino acids, including Taurine: African catfish *Clarias gariepinus* (Luten *et al.*, 2008) and Rainbow trout *O. mykiss* (Anderson 1992; Aksnes *et al.*, 2006).

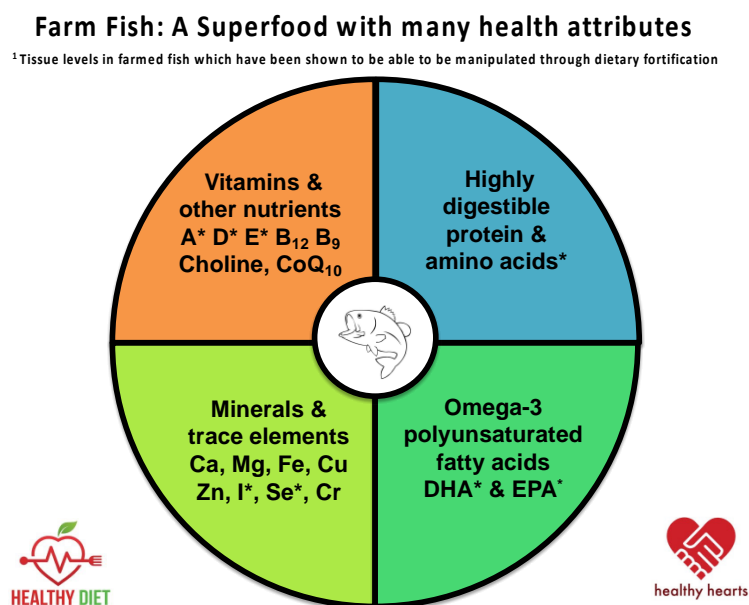


Figure 2. Tissue levels in farmed fish which can be manipulated through dietary fortification

Moreover, in addition to the above, the concentration of environmental pollutants, including heavy metals and POPs, can be reduced within farmed fish (if deemed a problem) through the dietary substitution of contaminated fish oils and fish meals with less contaminated lipid and protein meals (Bell *et al.*, 2005; Berntssen *et al.*, 2005; Berntssen *et al.*, 2011; Haldorsen *et al.*, 2017; Heshmati *et al.*, 2019; Turchini *et al.*, 2019).

Need for improved communication & consumption of farmed aquatic food products

Fish and seafood needs to be viewed by policy makers and governments as an important contributor to the global food basket, and the increased consumption of fish and seafood products actively promoted as a high-health and heart-healthy alternative to processed foods and terrestrial animal food products; the latter being particularly true for those countries suffering from a high incidence of obesity, coronary heart disease, diabetes and associated ailments (Henry *et al.*, 2020; HHP, 2011; Mozaffarian and Ludwig 2010; NHMRC, 2013; Pan *et al.*, 2012; Skerrett and Willett 2010; Tacon, Lemos & Metian, 2020; USDHHS/USDA, 2015; Wallin *et al.*, 2012, 2016; Willett *et al.*, 2019).

Table 3 presents recommended targets for a 2,500 Kcal healthy reference diet, including the possible ranges for different food groups, including fish. Moreover, it has been estimated that dietary changes from current high energy dense diets toward more healthy diets are likely to have significant health benefits, including averting between 7.4 to 10.8 million premature deaths per year (Willett *et al.*, 2019).

Table 3. Recommended targets for a healthy reference diet, with possible ranges, for an intake of 2,500 Kcal/day (compiled from Willet *et al.*, 2019)

Food group	Food subgroup	Reference diet (g/day)	Kcal/day	Possible ranges (g/day)
Whole grains	Rice, wheat, corn, beans, lentils	232	811	Total grains 0 to 60% of energy
Starchy roots	Potatoes, cassava	50	39	0 to 100
Vegetables	All vegetables	300		200 to 600
Fruits	All fruit	200	126	100 to 300
Dairy foods	Dairy foods	250	153	0 to 500
Protein sources	Beef, lamb	7	15	0 to 14
	Pork	7	15	0 to 14
	Chicken, other poultry	29	62	0 to 58
	Eggs	13	19	0 to 25
	Fish	28	40	0 to 100
	Beans, lentils & peas	50	172	0 to 100
	Soy foods	25	112	0 to 50
	Tree nuts & peanuts	50	291	0 to 75
Added fats	Unsaturated plant oils	40	354	20 to 80
	Dairy fats	0	0	
	Lard/tallow	5	36	0 to 5
Added sugars	All sweeteners	31	120	0 to 31

References cited

- Aksnes A, Hope B, Albrektsen S. (2006). Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. II: Flesh quality, absorption, retention and fillet levels of taurine and anserine. *Aquaculture*. 261(1):318–326. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.07.026
- Anderson RA. (1992). Chromium, glucose tolerance, and diabetes. *Biol Trace Elem Res*. 32(1-3):19–24. doi:10.1007/BF02784583
- Barber, L.B., S.H. Keefe., R.C. Antweiler., H.E. Taylor & R.D. Wass. (2006). Accumulation of contaminants in fish from waste- water treatment. *Environ Sci Technol*. 40(2):603–611. doi: 10.1021/es0514287
- Barbosa, V., Maulvault, A.L., Anacleto, P., Santos, M., Mai, M., Oliveira, H., Delgado, I., Coelho, I., Barata, M., Araújo-Luna, R., Ribeiro, L., Eljasik, P., Sobczak, M., Sadowski, J., Tórz, A., Panicz, R., Dias, J., Pousão-Ferreira, P., Carvalho, M.L., Martins, M., Marques, A. (2020). Enriched feeds with iodine and selenium from natural and sustainable sources to modulate farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common carp (*Cyprinus carpio*) fillets elemental nutritional value. *Food and chemical toxicology*, 140: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111330>
- Bell JG, McGhee F, Dick JR, Tocher DR. (2005). Dioxin and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Scottish farmed salmon (*Salmo salar*): effects of replacement of dietary marine fish oil with vegetable oils. *Aquaculture*. 243(1-4):305–314. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.10.016
- Berntssen MHG, Lundebye A-K, Torstensen BE. (2005). Reducing the levels of dioxins and dioxin-like PCBs in farmed Atlantic salmon by substitution of fish oil with vegetable oil in the feed. *Aquac Nutr*. 11(3):219–231. doi: 10.1111/j.1365-2095.2005.00345.x
- Berntssen MHG, Maage A, Julshamn K, Oeye BE, Lundebye A-K. (2011). Carry-over of dietary organochlorine pesticides, PCDD/Fs, PCBs, and brominated flame retardants to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets. *Chemosphere*. 83(2):95–103. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.017
- Berntssen M, Betancor MB, Caballero MJ, Hillestad M, Rasinger JD, Hamre K, Sele V, Amlund H, Ørnsrud R. (2018). Safe limits of selenomethionine and selenite supplementation to plant-based Atlantic salmon feeds. *Aquaculture*. 495:617–630. doi:10.1016/j.aquaculture.2018. 06.041
- Cameron, N.A., Petito, L.C., McCabe, M., Allen, N.B., O'Brien, M.J., Carnethon, M.R., Khan, S.S. (2021). Quantifying the sex-race/ethnicity-specific burden of obesity on incident diabetes mellitus in the United States, 2001 to 2016: MESA and NHANES. *J. Am. Heart Assoc*. 2021; 10:e018799. DOI: 10.1161/JAHA.120.018799
- Dey, M.M., Garcia, Y.T., Praduman, K., Piumsombun, S., Haque, M.S., Li, L., Radam, A., Senaratne, A., Khiem, N.T. and Koeshendrajana, S. (2008). Demand for fish in Asia: a cross-country analysis. *Australian Journal of Agricultural and Resource Economics*, 52(3), pp.321-338.
- Domingo, J.L., A. Bocio., G. Falco & J.M. Llobet. (2007). Benefits and risks of fish consumption. Part 1. A quantitative ana- lysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology*. 230(2-3):219–226. doi:10.1016/ j.tox.2006.11.054

- Escher, B.I., H.M. Stapleton & E.L. Schymanski. (2020). Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment. *Science*. 367(6476):388–392. doi:10.1126/science. aay6636
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FAO. (2021a). FAO Food Balance Sheet. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>. Last update February 19, 2020.
- FAO. (2021b). FishStatJ, a tool for fishery statistics analysis. Release: 4.01.1 May 2021. Universal Software for Fishery Statistical Time Series. Global aquaculture production: Quantity 1950–2019; Value 1950–2019; Global capture production. Rome, Italy: FAO. p. 1950–2019.
- FAO/WHO. (2011). Report of the joint FAO/WHO expert consultation on the risks and benefits of fish consumption, 25–29 January 2010. Rome, Italy: FAO. p. 50. Fisheries and Aquaculture Report No. 978 FIPM/R978 (En).
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP & WHO. (2021). The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. Transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cb4474en>
- Ferreira, C.M. Reis, N.D., Castro, A.O., Höfelmann, D.A., Kodaira, K., Silva, M.T., Galvao, T.F. (2021). Prevalence of childhood obesity in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Jornal de Pediatria*, <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2020.12.003>
- Forouhi, N.G., A. Misra., V. Mohan., R. Taylor & W. Yancy. (2018). Dietary and nutritional approaches for prevention and management of type 2 diabetes. *BMJ*. 361:k2234.
- Global Obesity Observatory (2021). https://data.worldobesity.org/country/mexico-139/#data_trends
- Kumar, V Habte-Tsion. H.M., Allen, K.M., Bowman, B.A., Thompson, K.R., El-Haroun, E., Filer, K., Tidwell, J.H. (2018). Replacement of fish oil with *Schizochytrium* meal and its impacts on the growth and lipid metabolism of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition*, 24: 1769-1781.
- Haldorsen A-K, Lock E-J, Rasinger JD, Nøstbakken OJ, Hannisdal R, Karlsbakk E, Wennevik V, Madhun AS, Madsen L, Graff IE, *et al.* (2017). Lower levels of Persistent Organic Pollutants, metals and the marine omega 3-fatty acid DHA in farmed compared to wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Environ Res*. 155:49–59. doi:10.1016/j.envres.2017.01.026
- Harare K, Berge RK, Lie Ø. (1998). Oxidative stability of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) fillet enriched in alpha -, gamma -, and delta -tocopherol through dietary supplementation. *Food Chem*. 62(2):173–178. doi:10.1016/S0308-8146(97)00209-4
- He, K. (2009). Fish, long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and prevention of cardiovascular disease—eat fish or take fish oil supplement? *Prog Cardiovasc Dis*. 52(2): 95–114. doi:10.1016/j.pcad.2009.06.003
- Hellberg, R.S., C.A.M. De Witt & M.T. Morrissey. (2012). Risk-benefit analysis of seafood consumption: a review. *Compr Rev Food Sci F*. 11(5):490–517. doi:10.1111/j.1541-4337. 2012.00200.x
- Henry CJ, Kaur B, Quek RYC. (2020). Are Asian foods as “fattening” as western-styled fast foods? *European J Clin Nutr*. 74(2):348–350. 2010). doi:10.1038/s41430-019- 0537-3
- Heshmati A, Sadati R, Ghavami M, Khaneghah AM. (2019). The concentration of potentially toxic elements (PTEs) in muscle tissue of farmed Iranian rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), feed, and water samples collected

- from the West of Iran: A risk assessment study. *Environ Sci Pollut Res.* 26(33):34584–34593. doi:10.1007/s11356-019-06593-x
- Harvard Health Publishing (HHP). (2011) September 14. Harvard to USDA: check out the healthy eating plate. Harvard Medical School. [accessed 2020 February 28]. <https://www.health.harvard.edu/blog/harvard-to-usda-check-out-the-healthy-eating-plate-201109143344>.
- Jiratanan T. (2007). Development of omega-3 fatty acid enhanced tilapia (*Oreochromis niloticus*) (alpha-Linolenic acid). *Dissertation Abstr Int.* 68(3, suppl. B):92.
- Jorge, T.B.F., Moura, G.S., Ribeiro-Junior, V., Donzele, J.L., Pedreira, M.M.. 2021, Sousa, T.V., Lanna, E.A.T. 2021. Effects of dietary supplementation time with *Schizochytrium* microalgae meal on growth, meat quality and fatty acid composition of Nile tilapia. *Aquaculture Research*, doi.org/10.1111/are.15597
- Julshamn K, Maage A, Waagbo R, Lundebye A-K. (2006). A preliminary study on tailoring of fillet iodine concentrations in adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) through dietary supplementation. *Aquac Nutrition.* 12(1):45–51. doi:10.1111/j.1365-2095.2006.00380.x
- Kousoulaki K, Mørkøre T, Nengas I, Berge RK, Sweetman J. (2016). Microalgae and organic minerals enhance lipid retention efficiency and fillet quality in Atlantic salmon (*Salmo salar* L. *Aquaculture.* 451:47–57. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.08.027
- Kwasek, K., A.L. Thorne-Lyman & M. Phillips. (2020). Can human nutrition be improved through better fish feeding practices? A review paper. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 25:1–14.
- Lawrence, J.M., Divers, J., Isom, S., Saydah, S., Imperatore, G., Pihoker, K., Marcovina, S.M., Mayer-Davis, E.J., Hamman, R.F., Dolan, L., Dabelea, D., Pettitt, D.J., Liese, A.D. (2021). Trends in prevalence of type 1 and type 2 diabetes in children and adolescents in the US, 2001-2017. *JAMA* 326(8):717-727.
- LiH,MengX,WanW,LiuH,SunM,WangH,WangJ. (2018). Effects of chromium picolinate supplementation on growth, body composition, and biochemical parameters in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem.* 44(5):1265–1274. doi:10.1007/s10695-018-0514-0
- Lie, Ø. editor. (2008). *Improving farmed fish quality and safety.* Cambridge: Woodland Publishing Ltd. p. 648.
- Lorentzen M, Maage A, Julshamn K. (1994). Effects of dietary selenite or selenomethionine on tissue selenium concentrations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture.* 121(4):359–367. doi:10.1016/0044-8486(94)90270-4
- Luten J, Schram E, and E. Elvevoll (2008). Tailor-made functional seafood for consumers: dietary modulation of selenium and taurine in farmed fish pp.343–362. In: Lie, Ø. editor. *Improving farmed fish quality and safety.* Cambridge: Woodland Publishing Ltd. p. 648.
- Manning BB, Li MH, Robinson EH. (2007). Feeding Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, diets amended with refined marine fish oil elevates omega-3 highly unsaturated fatty acids in fillets. *J World Aquaculture Soc.* 38(1):49–58. doi:10.1111/j.1749-7345.2006.00072.x
- Manning BB, Li MH, Robinson EH, Peterson BC. (2006). Enrichment of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fillets with conjugated linoleic acid and omega-3 fatty acids by dietary manipulation. *Aquaculture.* 261(1):337–342. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.07.029

- Maule, A.G., A.L. Gannam & J.W. Davis. (2007). Chemical contaminants in fish feeds used in federal salmonid hatcheries in the USA. *Chemosphere*. 67(7):1308–1315. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.11.029
- Mihalca GL, Tit O, Tit M, Mihalca A. (2011). Effect of dietary alpha-tocopheryl acetate on alpha-tocopherol content of novel omega-3-enhanced farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *J Agroalim Processes Technol*. 17(3):295–302.
- Michikawa T, Inoue M, Shimazu T, Sawada N, Iwasaki M, Sasazuki S, Yamaji T, Tsugane S. (2012). Seaweed consumption and the risk of thyroid cancer in women: The Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Eur J Cancer Prev*. 21(3):254–260. doi:10.1097/CEJ.0b013e32834a8042
- Morabito, S., Silvestro, S. and Faggio, C. (2018). How the marine biotoxins affect human health. *Natural Product Research*, 32(6):621-631.
- Mozaffarian D, Ludwig DS. (2010). Dietary guidelines in the 21st century: a time for food. *JAMA*. 304(6):681–682. doi:10.1001/jama.2010.1116
- Nanton DA, Ruohonen K, Robb DHF, El-Mowafi A, Hartnell GF. (2012). Effect of soy oil containing stearidonic acid on growth performance and fillet fatty acid composition of Atlantic salmon. *Aquacult Nutr*. 18(6):640–650. doi:10.1111/j.1365-2095.2011.00922.x
- Ng W-K, Chong C-Y, Wang Y, Romano N. (2013). Effects of dietary fish and vegetable oils on the growth, tissue fatty acid composition, oxidative stability and vitamin E content of red hybrid tilapia and efficacy of using fish oil finishing diets. *Aquaculture*. 372-375:97–110. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.10.030
- National Health and Medical Research Council (NHMRC). (2013). *Eat for health: Australian dietary guidelines*. Canberra, Australia: National Health and Medical Research Council. p. 210.
- Nicklisch, S.C.T., L.T. Bonito., S. Sandin & A. Hamdoun. (2017). Geographic differences in persistent organic pollutant levels of Yellowfin Tuna. *Environ Health Perspect*. 125(6): 067014. doi:10.1289/EHP518
- Nonwachai T, Purivirojkul W, Limsuwan C, Chuchird N, Velasco M, Dhar AK. (2010). Growth, nonspecific immune characteristics, and survival upon challenge with *Vibrio harveyi* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) raised on diets containing algal meal. *Fish Shellfish Immun*. 29(2):298–304. doi:10.1016/j.fsi.2010.04.009
- Pan A, Malik V, Hu FB. (2012). Exporting diabetes to Asia: the impact of western-style fast food. *Circulation*. 126(2): 163–165. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.115923
- Petenuci ME, Schneider VVA, Lopes AP, Gonçalves RM, Dos Santos VJ, Matsushita M, Visentainer JV. (2018). Effect of alpha-linolenic acid sources in diets for Nile Tilapia on fatty acid composition of fish fillet using principal component analysis. *J Aquat Food Prod Technol*. 27(4):464–476. doi:10.1080/10498850.2018.1448917
- Reames E. (2012). *Nutritional benefits of seafood*. Stoneville, MS: Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) Publication No. 7300. p. 6.
- Ribeiro A.R., Goncalves A, Bandarra N, Nunes ML, Dinis MT, Dias J, Rema P. (2017). Natural fortification of trout with dietary macroalgae and selenised-yeast increases the nutritional contribution in iodine and selenium. *Food Res Internat*. 99(3):1103–1109. doi:10.1016/j.foodres.2016. 10.030

- Rosenlund, G., G. Corraze, M. Izquierdo, and B.E. Tortensen. (2011). The effects of fish oil replacement on nutritional and organoleptic qualities of farmed fish, pp.487-522. In: Turchini G.M., Ng W.-K., Tocher D.R., editors. Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. CRC Press, Taylor & Francis Group. p. 551.
- Sargent, J.R. & A.G.J. Tacon. (1999). Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. Proc Nutr Soc. 58(2):377–383. doi:10.1017/S0029665199001366
- Sarker PK, Kapuscinski AR, Lanois AJ, Livesey ED, Bernhard KP, Coley ML. (2016). Towards sustainable aqua-feeds: complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Plos One. 11(6):e0156684. doi:10.1371/journal.pone.0156684
- Schmid S, Ranz D, He ML, Bukard S, Lukowics MV, Reiter R, Arnold R, LeDeit H, David M, Rambeck WA. (2003). Marine algae as natural source of iodine in the feeding of freshwater fish: a new possibility to improve iodine supply in man. Rev Med Vet. 154:645–648.
- Schmid, P., M. Kohler., E. Gujer., M. Zennegg & M. Lanfranchi. (2007). Persistent organic pollutants, brominated flame retardants and synthetic musks in fish from remote alpine lakes in Switzerland. Chemosphere. 67(9):S16–S21. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.05.080
- Schram E, Pedrero Z, Camara C, van der Heul JW, Luten BJ. (2008). Enrichment of African catfish with functional selenium originating from garlic. Aquaculture Res. 39(8): 850–860. doi:10.1111/j.1365-2109.2008.01938.x
- Sele V, Ørnsrud R, Sloth JJ, Berntssen MHG, Amlund H. (2018). Selenium and selenium species in feeds and muscle tissue of Atlantic salmon. J Trace Elem Med Bio. 47: 124–133. doi:10.1016/j.jtemb.2018.02.005
- Sigurgisladottir S, Parrish CC, Lall SP, Ackman RG. (1994). Effects of feeding natural tocopherols and astaxanthin on Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillet quality. Food Res Internat. 27(1):23–32. doi:10.1016/0963-9969(94)90174-0
- Silva, L.E.S., Oliveira, M.M., Stopa, S.R., Gouvea, E.C.D.P., Ferreira, K.R.D., Santos, R.O., Valença Neto, P.F., Macário, E.M., Sardinha, L.M.V. (2021). Temporal trend of overweight and obesity prevalence among Brazilian adults, according to sociodemographic characteristics, 2006-2019. Epidemiol. Serv. Saude, Brasília, 30(1):e2020294, 2021. Doi: 10.1590/S1679-49742021000100008
- Skerrett PJ, Willett WC. (2010). Essentials of healthy eating: a guide. J Midwifery Womens Health. 55(6):492–501. doi: 10.1016/j.jmwh.2010.06.019
- Sprague M, Dick JR, Tocher DR. (2016). Impact of sustainable feeds on omega-3 long-chain fatty acid levels in farmed Atlantic Salmon, 2006–2015. Sci Rep. 6(1):21892. doi:10.1038/srep21892
- Stoneham TR, Kuhn DD, Taylor DP, Neilson AP, Smith SA, Gatlin DM, Chu H, O’Keefe SF. (2018). Production of omega-3 enriched tilapia through the dietary use of algae meal or fish oil: Improved nutrient value of fillet and offal. Plos One. 13(4):e0194241. doi:10.1371/journal.pone.0194241
- Tacon, A.G.J. (2020). Trends in global aquaculture and aqua-feed production: 2000–2017. Rev Fish Sci Aquacult. 28(1):43–56. doi:10.1080/23308249.2019.1649634
- Tacon, A.G.J. & M. Metian. (2008). Aquaculture feed and food safety: the role of FAO and Codex Alimentarius. Ann Newyork Acad Sci. 1140(1):50–59. doi:10.1196/annals.1454.003

- Tacon A.G.J. & M. Metian. (2013). Fish Matters: importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. *Rev Fish Sci.* 21(1):1–17.
- Tacon, A.G.J. & M. Metian. (2017). Food matters: fish, income, and food supply - a comparative analysis, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 26(1):15-28.
- Tacon, A.G.J., D. Lemos, and M. Metain. (2020). Fish for health: improved nutritional quality of cultured fish for human consumption. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28(4):449–458.
- Torstensen B, Froyland L, Ormsrud R, Lie O. (2004). Tailoring of a cardioprotective fillet fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed vegetable oils. *Food Chem.*87(4):567–580. doi:10.1016/j.foodchem.2004.01.009
- Turchini GM, Trushenski JT, Glencross BD. (2019). Thoughts for the future of aquaculture nutrition: realigning perspectives to reflect contemporary issues related to judicious use of marine resources in aquafeeds. *North Am J Aquacult.* 81(1):13–39. doi:10.1002/naaq.10067
- US Department of Agriculture (USDA). (2018). Composition of Foods: raw, processed, prepared. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Legacy April 2018, Slightly revised July 2018. <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>.
- U.S. Department of Health & Human Services and U.S. Department of Agriculture (USDHHS/USDA). (2015). 2015–2020 Dietary Guidelines for Americans. 8th Edition. December 2015. <http://health.gov/dietaryguidelines/2015/guidelines/>.
- Verbeke, W., I. Sioen., Z. Pieniak., J. Van Camp & S. De Henauw. (2005). Consumer perception versus scientific evidence about health benefits and safety risks from fish consumption. *Public Health Nutr.*8(4):422–429. doi:10.1079/PHN2004697
- Vitenskapskomiteen (VKM). (2014). Benefit-risk assessment of fish and fish products in the Norwegian diet – an update. Scientific Opinion of the Scientific Steering Committee. VKM Report 15. Oslo, Norway. p. 293. ISBN: 978-82-8259-159-1. www.vkm.no.
- Waagbø R, Sandnes K, Torrissen OJ, Sandvin A, Lie Ø. (1993). Chemical and sensory evaluation of fillets from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed three levels of N-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E. *Food Chem.*46(4):361–366. doi:10.1016/0308-8146(93) 90005-Z
- Wallin, A., D. Di Giuseppe., N. Orsini., P.S. Patel., N.G. Forouhi & A. Wolk. (2012). Fish consumption, dietary long-chain n-3 fatty acids, and risk of type 2 diabetes-systemic review and met-analysis of prospective studies. *Diabetes Care.*35(4):918–929. doi:10.2337/dc11-1631
- Wang, Y., Li, M., Filer, K., Xue, Y., Ai, Q., Mai, K. (2016). Replacement of fish oil with a DHA-rich *Schizochytrium* meal on growth performance, activities of digestive enzyme and fatty acid profile of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture Nutrition*, 23:1113–1120.
- Watters CA, Rosner LS, Franke AA, Dominy WD, Klinger- Bowen R-E, Tamaru CS. (2013). Watters CA, Rosner LS, Franke AA, Dominy WD, Klinger- Bowen R-E, Tamaru CS. 2013. Nutritional Enhancement of long-chain omega-3 fatty acids in Tilapia (*Oreochromis honorum*). *Bamidgeh.* 65(869):1–7.
- Weber, K. & H. Goerke. (2003). Persistent organic pollutants (POPs) in Antarctic fish: levels, patterns, changes. *Chemosphere.* 53(6):667–678. doi:10.1016/S0045-6535(03) 00551-4

- WHO. (2017). The double burden of malnutrition. Policy brief. Geneva: World Health Organization; 2017. WHO/NMH/NHD/17.3, 11p.
- WHO. (2021a). Malnutrition, 9 June 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>
- Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S., Garnett, T., Tilman, D., DeClerck, F., Wood, A. and Jonell, M., et al. (2019). Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *The Lancet*, 393(10170), pp.447-492.
- World Bank (2021b). Percentage adults living with obesity, selected countries, 1960-2019. https://data.worldobesity.org/country/mexico-139/#data_trends
- Xanthos, D. & T.R. Walker. (2017). International policies to reduce plastic marine pollution from single-use plastics (plastic bags and microbeads): A review. *Mar Pollut Bull.* 118(1-2):17–26. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.02.048

Últimos Avances en el Estudio de la Biosíntesis de Ácidos Grasos Omega-3 de Cadena Larga en Invertebrados Acuáticos

Óscar Monroig*, Alberto Ribes-Navarro, Marc Ramos-Llorens, Andrea Villena-Rodríguez,
Khalida Bainour, Francisco Hontoria, Juan C. Navarro

Instituto de Acuicultura Torre de la Sal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATS-
CSIC), Ribera de Cabanes s/n, 12595 Castellón, España

E-mail: oscar.monroig@csic.es

Resumen

Los lípidos de la dieta son compuestos que proporcionan energía y nutrientes esenciales a los animales, incluidas las especies acuáticas cultivadas. Entre los compuestos lipídicos con mayor importancia en acuicultura destacan los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ($\geq C20$) (en inglés, *long-chain polyunsaturated fatty acids*, LC-PUFA), concretamente el ácido eicosapentaenoico (EPA), el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (ARA). Además de cubrir necesidades fisiológicas en los peces de acuicultura, asegurando su normal crecimiento y desarrollo, EPA y DHA, conocidos como “omega-3 de cadena larga” (en adelante “ $\omega 3$ LC-PUFAs”), son considerados compuestos saludables para el ser humano. Tradicionalmente, los requerimientos de ácidos grasos esenciales de peces de cultivo y la provisión de $\omega 3$ LC-PUFAs en el pescado de acuicultura se han garantizado mediante la inclusión de ingredientes marinos como la harina y, especialmente, el aceite de pescado, ambos naturalmente ricos en EPA y DHA. La industria de piensos para acuicultura utiliza alrededor del 75 % de las harinas y aceites de pescado producidas a escala global. El carácter finito de estas materias primas, unido al previsible aumento en su demanda para garantizar la predecible expansión del sector, han impulsado la búsqueda de alternativas que permitan aliviar la presión sobre la explotación de pesquerías de las que derivan. Entre estas alternativas, los invertebrados marinos se han postulado como una fuente alternativa de $\omega 3$ LC-PUFAs para acuicultura y eso ha motivado, en parte, el interés por conocer los mecanismos endógenos por los que estos animales pueden biosintetizar $\omega 3$ LC-PUFAs esenciales como EPA y DHA.

Las rutas de biosíntesis ω 3 LC-PUFAs en invertebrados acuáticos están relativamente poco estudiadas en comparación con las de vertebrados, incluidos los peces. Desde los trabajos pioneros en el pulpo común *Octopus vulgaris*, se ha producido un avance notable que ha permitido establecer que muchos invertebrados marinos, entre los que se incluyen moluscos, equinodermos, crustáceos y poliquetos, tienen sistemas enzimáticos que los capacitan para producir ω 3 LC-PUFAs endógenamente. Hay dos tipos de enzimas con especial protagonismo en las rutas biosintéticas de ω 3 LC-PUFAs de animales. Por un lado, las denominadas “elongasas” (o “Elovl” del inglés “*elongation of very long-chain fatty acid proteins*”) son responsables de extender la cadena hidrocarbonada de un ácido graso para producir otros dos carbonos más largos. Elongasas de los tipos Elovl2/5 y Elovl4, entre otras, juegan papeles determinantes en la producción de ω 3 LC-PUFAs de invertebrados. El segundo tipo de enzimas cruciales en las rutas biosintéticas de ω 3 LC-PUFAs son las “desaturasas”, enzimas que catalizan la inserción de un doble enlace (insaturación) en un ácido graso que actúa como sustrato. Es importante señalar que existen dos tipos de desaturasas con funciones en las rutas de biosíntesis de ω 3 LC-PUFAs de animales. Por un lado, están las llamadas “*front-end desaturases*” (Fed), que son enzimas que añaden dobles enlaces entre otro ya existente y el grupo carboxilo del ácido graso del sustrato. Esto hace que el producto de desaturación mantenga su serie, es decir, un ácido graso de la serie “omega-3” se convierte en otro también omega-3 tras la acción de desaturasas Fed. Los animales vertebrados e invertebrados tienen Fed que introducen dobles enlaces en posiciones Δ 4, Δ 5, Δ 6 o Δ 8. Sin embargo, existe una diferencia fundamental entre vertebrados e invertebrados. Mientras que las únicas desaturasas implicadas en las rutas de biosíntesis de ω 3 LC-PUFAs en vertebrados son Fed, algunos invertebrados poseen un segundo tipo de desaturasas llamadas “*methyl-end desaturases*” u “*omega desaturases*” (ω des), un tipo de desaturasas que permite la biosíntesis de ω 3 LC-PUFAs *de novo* a partir de ácidos grasos de otras series y que había sido descrito en microorganismos, pero que se creía ausente en animales. Las enzimas ω des pueden tener diferentes funciones, por ejemplo, una ω 3 des es una desaturasa que introduce la nueva insaturación 3 carbonos más allá del grupo metilo, con lo cual es capaz de convertir ω 6 LC-PUFAs en los correspondientes ω 3 LC-PUFAs. Como se ha adelantado anteriormente, este tipo de enzimas, que se creía inexistente en animales, ha sido descubierto recientemente en muchos invertebrados, confiriéndoles, por lo tanto, la capacidad de producir ω 3 LC-PUFAs *de novo* de forma similar a la de los microorganismos. Esta capacidad biosintética abre la posibilidad de cultivar invertebrados acuáticos a partir de sustratos pobres

nutricionalmente (bajos en ω 3 LC-PUFAs) y a menudo de desecho, para producir una nueva fuente alternativa y sostenible de ingredientes ricos en ω 3 LC-PUFAs. Esta estrategia innovadora para la producción de ω 3 LC-PUFAs se plantea como “alternativa” a las fuentes tradicionales como son las harinas y aceites de pescado procedentes de pesquerías y que, como ya se ha comentado, están en su límite de explotación, si no sobreexplotadas. Además, es también “sostenible” porque, aparte de aliviar la presión sobre recursos naturales finitos y sobreexplotados, representa una forma de reutilizar materiales de desecho de otras industrias de producción de alimento (p. ej., agricultura) para producir biomasa de alto valor nutritivo y económico, aplicando para ello principios de Economía Circular.

Esta ponencia tiene como objeto proporcionar una visión actualizada sobre los avances alcanzados en esta nueva aproximación científica, que abarca desde la nutrición animal a la ecología trófica marina, pasando por la bioquímica y la biotecnología. Para ello, se realizará una revisión sobre la presencia y la función de enzimas Elov1, Fed y ω des en los principales grupos de invertebrados de mayor potencial interés y proyección para el desarrollo de la mencionada estrategia.

Palabras clave: Biosíntesis, ácidos grasos omega-3, invertebrados acuáticos

Agradecimientos

Este estudio ha recibido fondos del proyecto RTI2018-095119-B-100 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa, así como del proyecto PCI2020-111960 financiado por MCIN/AEI /10.13039/501100011033 y por la Unión Europea NextGenerationEU/PRTR. Khalida Bainour está financiada por un contrato predoctoral Santiago Grisolia (GRISOLIA/2021/120) de la Generalitat Valenciana.

Acuicultura Simbiótica como Nuevo Paradigma Productivo: Reduciendo Impactos y Aumentando Beneficios

David Celdrán Sabater

Dirección: San José, San Pedro, Costa Rica, The Green Lodge N° 9

E-mail: bioaquafloc@gmail.com

Resumen

La acuicultura simbiótica se basa en la utilización de microorganismos que ejercen una acción beneficiosa directa o indirecta sobre la salud del animal y sobre la calidad del agua de cultivo. Se reproducen varios tipos de microorganismos, bacterias, protozoos, levaduras y plancton que entablarán una relación simbiótica con camarones y peces que adicionalmente les servirán también como alimento de altísima calidad. Las bacterias que se utilizan pueden ejercer un efecto biorremediador. Esto se puede observar en el caso de las bacterias nitrificantes, las cuales eliminan amonio. Otros organismos biorremediadores son las bacterias heterótrofas, los protozoos y los hongos los cuales eliminan materia orgánica tal como heces y alimento no ingerido. También se usan las bacterias probióticas en esta tecnología. Estas tienen un efecto beneficioso en el tracto digestivo de camarones y peces, mejorando la supervivencia. Por último, el plancton ayuda a la biorremediación y sirve de alimento altamente nutritivo para peces y camarones.

Las tecnologías biofloc y aquamimicry son en realidad dos tecnologías simbióticas. La tecnología simbiótica es toda aquella que utiliza microorganismos para el beneficio del cultivo. Asimismo, debe haber presencia de bioflóculos o coloides que no es más que esos microorganismos aglutinados en pequeñas formaciones globosas y de aspecto irregular. Actualmente la compañía BIOAQUAFLOC, desarrolla una tecnología simbiótica muy particular. En ella se tiene en cuenta los principios estrictos de la tecnología biofloc respecto del control de la calidad de agua y la corrección de sustancias nitrogenadas se realiza la adición de melaza. Sin embargo, se utilizan también algunos principios de la tecnología aquamimicry tal como la utilización de un toilet en el estanque que extrae sólidos sedimentados. También, como en aquamimicry, se apuesta por la adición de fermentos de cereal, leguminosos. Se usa aireadores que garanticen un movimiento y oxigenación del agua suficiente. Por último, se siembra a altas densidades, por encima de los 250 camarones/m² y 100 peces/m³. Aunque también estamos haciendo experiencias en sistemas rústicos extensivos con acuicultura simbiótica sin aireación ni extracción de sólidos con espectaculares resultados productivos (densidades de 30 camarones/m² y 10 peces/m³)

Bioaquafloc usa un protocolo de generación de bioflóculos tanto para la maduración del agua antes de la siembra como a lo largo del ciclo. Esta combinación de técnicas simbióticas es extraordinariamente exitosa y principalmente evita la acumulación de nitrógeno amoniacal, afección de enfermedades y buenos desempeños en conversión del alimento (FCA<1).

Los beneficios son muchos, pero principalmente los podemos agrupar en el aumento de la seguridad en la actividad acuícola, reducción de enfermedades, reducción de costos de alimentación, aumento de la calidad de agua y cuidado del medio ambiente (no utilización de harinas de pescado en el alimento, recambio cero de agua y no adición de productos químicos) entre otros.

Palabras claves: *Acuicultura, Acuicultura simbiótica, Fermentos, Tilapia, Camarón, Bioflóculos, tecnología biofloc, tecnología aquamicmiry*



Estado actual del mundo

El mayor reto al que nos enfrentamos como especie humana es la sobrepoblación. Se estima que para el año 2050 la población mundial sobrepasará los 9,7 mil millones de habitantes, lo que supone un 30% más que en la actualidad. (FAO 2009).

Además, la población que se encontrará con algún grado de pobreza será muy alto. África rondará porcentajes que irán en su mayoría del 30% al 100% de la población en estado de pobreza o extrema pobreza. El índice utilizado para esta evaluación se refiere a la pobreza multidimensional (MPI: Multidimensional poverty index). Esto es teniendo en cuenta la educación o acceso a sanidad. Hemos de considerar que el 1% de la población acumula el 82% de la riqueza global (Informe económico mundial DAVOS 2019). Lo que reafirma las enormes desigualdades que estamos experimentando. Solo 8 personas tienen la mitad de la riqueza del planeta, mientras existen 1300 millones de personas pobres de los cuales 730 millones viven en extrema pobreza (Davos 2019). Por otra parte, la FAO estima que los países que más crecerán en los próximos años serán los países subdesarrollados con lo que estas desigualdades acrecentarán.

Demanda mundial de proteína

Para intentar paliar estas desigualdades, la organización de las Naciones Unidas promueve la iniciativa AGENDA 2030, que se compone de 17 objetivos encaminados a mejorar la economía, la sociedad y el medio ambiente. Sin embargo, estos están lejos de cumplirse. Así que se lanzó una campaña aún más ambiciosa llamada ¿Cómo alimentar al mundo en 2050? En este sentido, ya en el foro de expertos de alto nivel en Roma 12-13 octubre del 2009 se estimó que la producción anual de carne deberá aumentar en más de 200 millones de toneladas hasta alcanzar los 470 millones. Países como China están además aumentando la necesidad de proteína mundial porque están cambiando sus hábitos alimenticios e incluyendo más carne en sus dietas. La demanda mundial actual de carne ha sobrepasado la cantidad que la industria cárnica actual es capaz de producir. De esta manera se ha recurrido a una mayor quema de bosques para transformarlos en pastizales para ganado.

La pesca como solución a la demanda de proteína

Desde la década de los 70's la pesca ha estado dedicada a abastecer la demanda mundial de proteína. Sin embargo, esto ha llevado a una sobreexplotación de los recursos pesqueros. En 2015, de las 16 áreas estadísticas principales, el Mediterráneo y el Mar Negro registraron el mayor porcentaje 62,2% de poblaciones insostenibles, seguidas de cerca por el Pacífico sudoriental con un 61,5% y el Atlántico sudoccidental con un 58,8%. (FAO 2009).

Así pues, tras cinco décadas de sobreexplotación pesquera ahora nos encontramos no solo con el problema de sobrepoblación humana sino también con un grave problema de sobrepesca mundial.

La acuicultura como nueva posible solución.

Ante esta problemática, gobiernos e instituciones colocaron a la actividad acuícola como un actor importante para la demanda mundial de proteína. Así pues, la acuicultura fue aumentando hasta que en 2016 llegó a generar 80 millones de toneladas de peces y mariscos (FAO 2018). Sin embargo, existe un gran impedimento para que la acuicultura se convierta en una solución real. Los requerimientos nutricionales de las especies acuícolas cultivadas pasan por la inclusión de ácidos grasos esenciales tal como ácido Docosaheptaenoico (DHA) el cual solo tiene origen marino. Y la fuente más barata de origen marino que contiene este ácido graso esencial es la harina de pescado. Así que, hemos estado pescando todas estas décadas para convertir ese pescado en harina de pescado para generar alimento para acuicultura. Si el alimento de nuestros organismos de cultivo no contiene harinas de pescado, estos no crecen. Hasta ahora.

Acuicultura simbiótica como nuevo paradigma productivo

En la acuicultura simbiótica se crea una explosión de zooplancton y bacterias beneficiosas que pueden estar agrupadas en bioflóculos, biofilm o coloides (definición: Dr. David Celdran). Estas agrupaciones de microorganismos y una pequeña parte de fitoplancton son muy ricos en DHA. Tras años de investigaciones científicas al respecto se comprobó que sustituyendo la alimentación convencional por bioflóculos y harina de soya, la supervivencia y el factor de conversión del alimento se mantenían igual que con dietas comerciales (Bauer *et al.*, 2012). Este hecho supone un gran hito en la acuicultura moderna puesto que ya no es necesario depender de las harinas de pescado. Existen experimentos donde además los crecimientos en camarón con bioflóculos superaban con creces los crecimientos convencionales con alimento comercial (Kuhn *et al.*, 2009).

La acuicultura simbiótica reporta un gran número de beneficios que veremos a lo largo de los siguientes temas.

Sistemas de cultivo simbióticos

- **Sistemas Súper Intensivos simbióticos:**

Un sistema súper intensivo es donde la densidad de siembra es muy alta y se asiste continuamente con oxígeno, abundante alimento y un reciclado constante de las sustancias tóxicas y residuos del agua. La acuicultura simbiótica es una tecnología súper intensiva puesto que todos esos requisitos los lleva a cabo los bioflóculos. El tamaño de los estanques suele ser de hasta unos 5.000 m² de geomembrana, o de tierra. Se manejan densidades de siembra: de hasta 250-400 PL/m² y unos 45-60 alevines de peces por m³. La aireación es obligatoria, la alimentación es artificial y los bioflóculos representan hasta un 30% de la ingesta del animal. El manejo técnico se considera experimentado y los parámetros del agua están muy controlados. Las producciones varían de 20 a 100 Ton/Ha al año en camarón y de 190 a 250 tn/ha al año de tilapia.

- **Acuicultura simbiótica en sistemas semi intensivos:**

Por supuesto la acuicultura simbiótica puede aplicarse a sistemas semi-intensivos con densidades aproximadas de 20 a 50 camarones/m². En estos sistemas no existe toilet y no hay aireación asistida. Un problema intrínseco de este sistema es el descenso del oxígeno disuelto en horas nocturnas. La acuicultura simbiótica aportará enzimas como celulasas que controlarán la población de microalgas evitando eventos de anoxia en la noche. Otro problema es la evaporación que nos obligará a realizar recambios parciales regulares. Estas reposiciones pueden comprometer la salud de los camarones por la entrada de enfermedades. La tecnología simbiótica previene el inicio de periodos de enfermedad debido a los ácidos orgánicos que se generan en el agua junto a moléculas como el PHB (POLI BETA HIDROXI BUTIRATO) el cual ataca a agentes patógenos.

La acuicultura simbiótica generará bioflóculos en suspensión o un biofilm o perifiton en el fondo (si no existe movimiento en el agua que suspenda los bioflóculos). Estos bioflóculos son una excelente fuente de proteínas, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales (Avnimelech 2015). Asimismo, generan sustancias que combaten patógenos e incentivan el crecimiento del zooplancton que es un alimento altamente nutritivo.

Los fermentos que aplicamos en la misma generarán ciertas condiciones beneficiosas en nuestro estanque: Aumentan la calidad del agua y combaten igualmente enfermedades. También desarrollan las cadenas tróficas del zooplancton y sirven como alimento pre-digerido.

Referencias

Agenda 2030 FAO:

[https://www.fao.org/sustainable-development-](https://www.fao.org/sustainable-development-goals/es/#:~:text=La%20alimentaci%C3%B3n%20y%20la%20agricultura%20en%20la%20Agenda%202030%20para%20el%20Desarrollo%20Sostenible&text=Erradicar%20la%20pobreza%20y%20el,de%20la%20Agenda%20de%202030.)

[goals/es/#:~:text=La%20alimentaci%C3%B3n%20y%20la%20agricultura%20en%20la%20Agenda%202030%20para%20el%20Desarrollo%20Sostenible&text=Erradicar%20la%20pobreza%20y%20el,de%20la%20Agenda%20de%202030.](https://www.fao.org/sustainable-development-goals/es/#:~:text=La%20alimentaci%C3%B3n%20y%20la%20agricultura%20en%20la%20Agenda%202030%20para%20el%20Desarrollo%20Sostenible&text=Erradicar%20la%20pobreza%20y%20el,de%20la%20Agenda%20de%202030.)

Avnimelech, Y. 2015. *Bioflocs Tehcnology-A practical Guide Book*, 3rd Edition. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. United States.

Bauer, W., Prentice-Hernandez, C., Tesser, M. B., Wasielesky Jr, W., & Poersch, L. H. (2012). Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 342, 112-116.

Davos 2019. [https://es.weforum.org/focus/davos-2019-92fa6567-1647-40fc-a860-d2548f2bfbe2.](https://es.weforum.org/focus/davos-2019-92fa6567-1647-40fc-a860-d2548f2bfbe2)

FAO. (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018-Meeting the sustainable development goals*. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FAO 2009 Foro de expertos de alto nivel, del 13-13 de octubre, Roma 2009 FAO 2009- “Cómo alimentar al mundo en 2050”

http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf

Kuhn, D. D., Boardman, G. D., Lawrence, A. L., Marsh, L., & Flick Jr, G. J. (2009). Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. *Aquaculture*, 296(1-2), 51-57.

Application of Poly- β -hydroxybutyrate in Shrimp Health Management

¹Riya Rajeev, ¹P.S Seethalakshmi, ²George Seghal Kiran, Lucia Elizabeth Cruz Suarez³, Joseph Selvin^{1*}

¹Department of Microbiology, Pondicherry University, Puducherry 605014, India

²Department of Food Science and Technology, Pondicherry University, Puducherry 605014,

India. ³ Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Autónoma de Nuevo León, Cd. Universitaria, San Nicolas de los Garza, 66451, Nuevo León, México

*Corresponding author: josephselvins@gmail.com, jselvin.mib@pondiuni.edu.in

Abstract

Shrimp is one of the most cultured crustacean worldwide due to its high protein and nutrient content. At the same time shrimp aquaculture faces a huge challenge in controlling disease outbreaks. The extensive use of antibiotics to combat the infectious organisms has led to the emergence of antibiotic resistance which is a huge threat to humans and other living forms. Therefore, a more environment friendly treatment strategy should be devised. One such treatment option is the use of biopolymers such as polyhydroxyalkanoates (PHAs). The most widely used PHA is the anti-infective poly- β -hydroxybutyrate which can be fermented into immune stimulating short chain fatty acids by host bacteria or digestive enzymes. PHB produced by marine microorganisms are widely studied and considered to be a good source of PHB for industrial use. PHB has been found to possess multiple benefits to shrimp health which includes immune stimulation, antibacterial properties, increased secretion of digestive enzymes and growth promotion. Moreover, PHB-diet positively influences the gut microbiome of shrimp, therefore, promoting the overall health and growth.

Keywords: *Gut microbiome; PHB-diet; Poly- β -hydroxybutyrate; polyhydroxyalkanoates; shrimp aquaculture*

Introduction

Industrial shrimp monocultures are more prone to infectious diseases that have resulted in complete loss of farm shrimp populations (Selvin, 2010). Disease outbreaks in shrimp aquaculture has become a big hurdle which has stunted the growth and have resulted in the collapse of many shrimp aquaculture industries, irrecoverably (Asche *et al.*, 2021). *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) is a chief commercial shrimp variety that has been farmed worldwide (Wang *et al.*, 2015) because of its disease tolerance, adaptability to different environments and rapid growth (Xu and Pan 2012; Cui *et al.*, 2016). Intensive culture practices have resulted in the outbreak of several infectious diseases that have culminated into mass mortality of farmed shrimp in aquaculture settings (Kumar *et al.*, 2015; Joseph *et al.*, 2015).

It has been documented by many studies that extensive use of antibiotics in shrimp farms can result in the development of antimicrobial resistance and these microorganisms can infect humans and animals (Wegener *et al.*, 1999; Willis 2000). Therefore, antibiotics are no longer a solution for sustainable shrimp farming and other alternatives needs to be developed. Short chain fatty acids (SCFA) produced by bacteria following fermentation have been identified to possess many health benefits including resistance to infectious diseases and being biological and eco-friendly makes them ideal solution for sustainable aquaculture (Weitkunat *et al.*, 2015; Dobrowolska *et al.*, 2016). However, they are water-soluble and cannot be used directly in rearing systems due to poor intake of the compound by aquatic animals (De Schryver *et al.*, 2010). Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) is a water insoluble biodegradable polymer which can be digested by intestinal pH into monomeric forms like β -hydroxybutyric acid, a SCFA (De Schryver *et al.*, 2010). This makes PHB a suitable chemical that can act as a precursor for SCFA and can be up taken by aquatic animals effectively.

PHB has been identified as one of the promising alternatives for antibiotics in shrimp aquaculture by several researchers (Laranja *et al.*, 2014; Laranja *et al.*, 2017; Situmorang *et al.*, 2020). PHB has been found to possess multiple benefits to shrimp health and this includes immune stimulation, antibacterial properties, increased secretion of digestive enzymes and growth promotion (Duan *et al.*, 2017). This review discusses the sources of PHB and their degradation inside the host, with special emphasis on the beneficial role of PHB in shrimp disease management.

Biopolymers and PHB

Several microorganisms store their carbon and energy in the form of simple macromolecules in the presence of excess carbon and absence of sufficient amounts of nitrogen. Such structurally simple polymers as known as polyhydroxyalkanoates (PHAs). PHAs can be present up to 90% of the dry weight in the form of discrete granules (Anderson and Dawes, 1990; Defoirdt *et al.*, 2009). The source of carbon and the bacterial strain determines the chemical composition of PHAs (Simon-Colin *et al.*, 2008). Classification of PHAs are based on the number of carbons in the monomers. Monomers containing three to five carbons such as in polyhydroxybutyrate (PHB) and hydroxyvalerate (PHV) are called short-side-chain PHA (scl-PHA), while those containing six to sixteen hydroxyl fatty acids or aliphatic carbon sources are called medium-side-chain PHA (mcl-PHA) (Matsusaki *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2005; Chien *et al.*, 2007).

PHAs have a multitude of applications such as drug delivery agents, nutritional supplements, bioplastics, photographic materials, drugs, medical implants and fine chemicals (Orts *et al.*, 2008; Tokiwa & Calabia, 2008; Sudesh & Iwata, 2008; Chen & Wu, 2005a; Chen & Wu, 2005b; Chen, 2009). Due to the biocompatible and biodegradable nature, PHAs are widely used as bioplastics (non-petroleum based plastics) (Chien *et al.*, 2007). Bacterial PHAs are studied by polymer experts, microbiologists, chemists, biochemists as well as medical researchers (Chen, 2009) due to their immense applications. Microbial PHA producers have been isolated from the waste outlet of various treatment facilities. Microorganisms like *Agrobacterium*, *Actinobacillus*, *Sphaerotilus*, *Azotobacter*, *Rhodobacter* etc. are known for their ability to utilize organic waste for the production of PHA (Madison & Huisman, 1999; López-Cortés *et al.*, 2008).

One of the most studied PHAs, is the poly- β -hydroxybutyrate (PHB) (Lee, 1996; Defoirdt *et al.*, 2009). PHB is a simple linear polymer of D(-)-3-hydroxybutyric acid, first discovered in 1923 by Maurice Lemoigne, a French scientist. PHB was first identified in an aerobic spore-forming *Bacillus* "M" strain (Laranja & Bossier 2020). Apart from bacterial synthesis, which is the most commonly used production strategy (Lenz & Marchessault, 2005), PHB can also be obtained chemically by synthetic polymerization via ring opening (Vroman & Tighzert, 2009), naturally from natural/transgenic plants (Mousavioun, George & Doherty, 2012). Bacteria such as *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Rhizobium* etc. store energy and carbon in the form of PHB when phosphorus, nitrogen or oxygen are present in insufficient quantities while, carbon is in excess

amount (Anderson and Dawes 1990; Laranja & Bossier 2020). PHB in its native form is amorphous and after cell lysis, a partially crystallized form is released (Gowda & Shivakumar, 2019). Application of PHB in the polymer industry is limited due to its low thermal stability and brittle nature. Instead, its copolymers like 3-Hydroxyvalerate and 3-Hydroxybutyrate are used to make films, disposable food service ware and compost bags, due to greater toughness and flexibility. The monomers of PHB, i.e., 3-hydroxybutyrate acts as an efficient biocontrol agent, therefore, PHB have various biological applications (Gowda & Shivakumar, 2019). Research suggests the PHB aids in protecting host from various infections (Gowda & Shivakumar, 2019).

The anti-infective nature of PHB could be due to its hydrolysis into 3-hydroxy butyric acid (Ray *et al.*, 2017) in the host gut. The resulting SCFAs exhibits anti- pathogenic action based on the physiological condition of the organisms and physicochemical conditions of the external environment. However, the exact mechanism is still unclear (Ricke, 2003). Hence, SCFAs can be useful in treating microbial infections in aquaculture (Defoirdt *et al.*, 2007).

Marine PHB-producers

The increased production of non-biodegradable products has caused immense harm to the environment, therefore, there is huge interest in the production of biodegradable polymers through biological methods (Patnaik, 2006; Arun *et al.*, 2009). Biodegradable PHBs produced by marine microbes (Mohanrasu *et al.*, 2021), especially bacteria and archaea (Kavitha, Rengasamy & Inbakandan, 2018) find a wide variety of industrial as well as medical applications (Mohanrasu *et al.*, 2021). The endosymbionts of a marine sponge *Callyspongia diffusa* was studied for the production of PHB and it was found that *Bacillus subtilis* MSBN17 produced high amounts of PHB when pulp industry waste and tamarind kernel powder were provided as major substrate and co-substrate respectively (Sathiyarayanan *et al.*, 2013). *Vibrio natriegens* isolated from marine sediments was capable of producing PHB and had a short generation time of 9.8 min, which makes it a best candidate for industrial PHB production (Chien *et al.*, 2007).

Bacterium *Streptomyces lividans* and marine *Bacillus subtilis* produced low molecular weight PHB (14 000 Da) along with polyphosphate and calcium ions (Reusch, 1999 Kavitha, Rengasamy & Inbakandan, 2018). The bacterium *Ochrobactrum intermedium* isolated from oil waste contaminated sea water at Gulf of Mannar, Tamil Nadu, India, was capable of producing PHB by utilizing hydrocarbon wastes (Mahendhran *et al.*, 2018). A study from Tamil Nadu, India reported eleven naturally PHB producing cyanobacterial species which includes *Phormidium* sp.

(VIT-BMN3) (Gopi, Balaji & Muthuvelan, 2014). The marine sediment isolate *Vibrio azureus* BTKB33 produced 0.21 g/L PHB under submerged fermentation, which was highest among a total of 828 isolates (Sasidharan, Bhat & Chandrasekaran, 2015). Another PHB producer *Vibrio proteolyticus* strain was isolated from a marine environment in Korea (Hong *et al.*, 2019). PHB-producer *Pseudodonghicola xiamenensis*, which isolated from the Red Sea in Saudi Arabia could produce higher amount of PHB in a cost effective manner when supplemented with 4% (w/v) date syrup (Mostafa *et al.*, 2020a). A moderately halophilic *Vibrio harveyi* MCCB 284, isolated from tunicate *Phallusia nigra*, efficiently utilized glycerol for PHB accumulation up to 72% cell dry weight (Mohandas *et al.*, 2017). According to a study, it was found that PHB-producing bacteria such as *Erythrobacter aquimaris* could be isolated from marine mangrove rhizosphere (Mostafa *et al.*, 2020b) and hence, such rhizospheres should be further explored for commercially useful PHB-producers.

PHB degradation and anti-pathogenic effect

PHAs can undergo chemical decomposition as well as enzymatic degradation (Defoirdt *et al.*, 2009). PHBs being polymers of repeating SCFA monomers, its degradation in host gut results in the production of SCFAs which provide beneficial effects to the host (Gowda & Shivakumar, 2019) (**Fig 1**). PHB provided to the host through feed or bioencapsulation technique is hydrolyzed by gastric digestive enzymes of the host and/ or PHB depolymerase activity of gut microbiome (Kiran *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2010; Laranja & Bossier 2020; Defoirdt *et al.*, 2007). Low pH of the host gut may also be responsible for the release of β -hydroxybutyrate SCFAs, as revealed by a study on conducted on juvenile seabass fed with PHB-diet (De Schryver *et al.*, 2010; Laranja & Bossier 2020). Exposure to β -hydroxy-SCFAs could impact the cellular status of the such as lowering of cytoplasmic pH which makes the pathogen to utilize its energy on maintaining homeostasis, resulting in reduced cell growth, impaired virulence factors or cell death (Defoirdt *et al.*, 2009; Laranja & Bossier 2020). A study on *Artemia franciscana* revealed that the release of β -hydroxybutyrate via PHB hydrolysis provided energy to the host and inhibited the growth of pathogenic *Vibrio campbellii* (Defoirdt *et al.*, 2007).

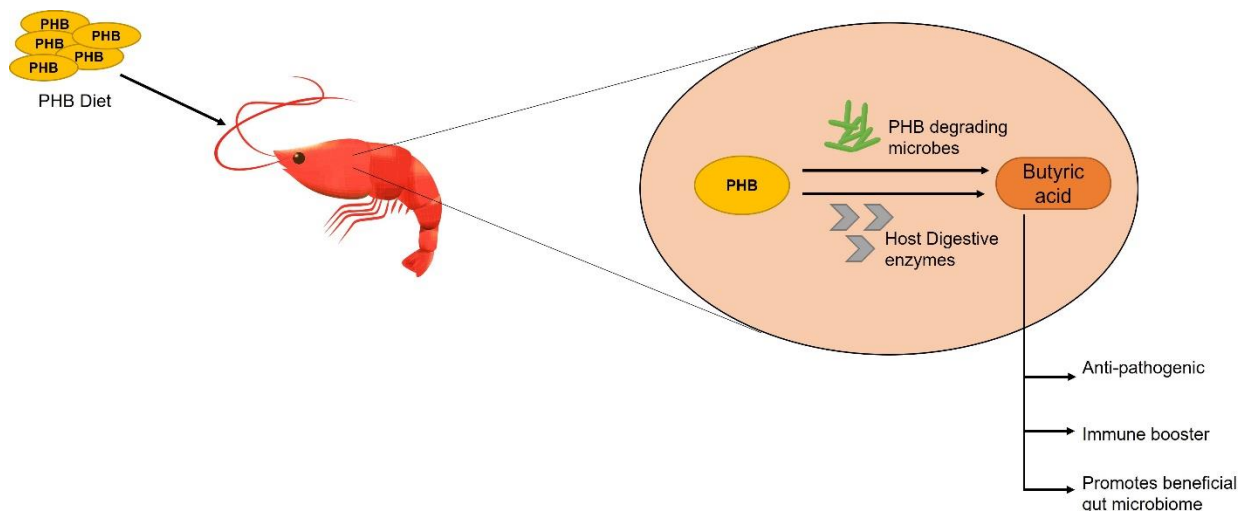


Figure 1: Effect of PHB on shrimp disease control. PHB supplemented in shrimp feed undergoes microbial or enzymatic degradation resulting in the production of butyric acid which shows anti-pathogenic and immune boosting activity along with promoting beneficial gut microorganisms.

The supplementation of PHB feed along with PHB degrading microbes improves the digestion and efficiency of the polymer feed (Gowda & Shivakumar, 2019). PHB-degrading microbes isolated from European sea bass, Siberian sturgeon, and giant river prawn when fed to brine shrimp larvae along with PHB diet increased the survival rate during *Vibrio campbellii* LMG 21363 infection (Liu *et al.*, 2010). Research shows that the PHB also alters the gut microbiome of the host and enhances the growth of beneficial microbes and inhibits the potential pathogenic growth (Laranja & Bossier 2020).

PHB as anti-infectives and immune stimulator

Infectious diseases are a huge burden in shrimp aquaculture industries worldwide and the alarming increase of antimicrobial resistance in them limits the option of antibiotic therapy (Seethalakshmi *et al.*, 2021). Polyhydroxy butyrates can be used in aquaculture practices as an effective alternative to antibiotics as they act as immune stimulating agents (Asiri and Chu 2020). Several studies have reported the anti-infective (Defoirdt *et al.*, 2007; Laranja *et al.*, 2014) and immune stimulating properties of PHB (Van Cam *et al.*, 2009; Laranja *et al.*, 2017; Baruah *et al.*, 2015). PHB exerts immune stimulatory activity by inducing Hsp70 biosynthesis, which further activates immune regulated genes such as *tgase*, *proPO* and *ftn* (Baruah *et al.*, 2015). Hemocytes are important components of prime immune system and they have significant role in improving cellular and humoral immune responses in shrimp (Robohm 1984; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Shrimp fed with PHB also exhibits enhanced levels of hemocyte, which could contribute to their enhanced immune response (Kiran *et al.*, 2020). Moreover, PHB diets are also reported to activate specific immune response in invertebrates. A study by Suguna *et al.* (2014) concluded that PHB diets enhances total peroxidases activity, serum lysozyme activity and antiprotease activity. Another mechanism that could contribute to the immune stimulating property of PHBs could be their ability to enhance the expression of mTOR signaling-related genes like *TOR*, *4E-BP*, *eIF4E2* and *eIF4E1 α* , by inhibiting autophagy (Duan *et al.*, 2017; Rojas-Morales *et al.*, 2016).

Vibriosis is a serious concern in aquaculture settings and accounts to huge economic losses (Lai *et al.*, 2015). In addition to its immune stimulatory activities, PHB have also been reported to possess antibacterial activity. Monomeric components of PHB are capable of inhibiting *Vibrio* pathogens under *in vitro* conditions (Halet *et al.*, 2007). The PHB polymer upon reaching shrimp intestine gets hydrolyzed to monomeric forms like short-chain β -hydroxy butyric acid, and can provide resistance to *Vibrio* infections (Defoirdt *et al.*, 2007). *In vitro* studies also shows that PHB can also suppress swimming motility of *Vibrio* pathogens which is an important virulence factor to invade and colonize host cells efficiently (Van Hung *et al.*, 2018). Elevated concentrations of PHB are also found to inhibit virulence factors in *Vibrio* spp. such as phospholipase expression and haemolysis, but did not suppress biofilm formation (Van Hung *et al.*, 2018). PHB molecules synthesized from *Brevibacterium casei* MSI04 attenuated the expression of virulence factors like haemolysin, bioluminescence, motility and colonization capacity (Kiran *et al.*, 2016). Also, these PHB molecules degrades the N-acyl-homoserine lactone and quorum-sensing signaling cascade,

which contributes to impairment of biofilm formation in bacterial pathogens (Kiran *et al.*, 2016). It can be understood from these studies that PHB molecules from different sources exhibit varying anti-virulent properties. Therefore, it will be worthy to investigate the factors that are responsible for such divergent biological activities.

Influence of PHB on shrimp microbiome

Aquatic species are continually exposed to their surrounding water and any changes in their surrounding microbiome or intestinal microbiome can upset the health and functioning of the host (Rajeev *et al.*, 2020). Several studies have pointed out the influence of diet on the shrimp microbiome (Daniel *et al.*, 2014; Prathiviraj *et al.*, 2021) and therefore a healthy microbiome of shrimp can be modulated by providing formulated dietary regimens. This not only reduces the use of antibiotics for shrimp disease management, but also makes shrimp produces more organic and safer to consume.

The normal microbiome of *Penaeus monodon* comprises of phyla Gammaproteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria and Actinobacteria (Rungrassamee *et al.*, 2014). Alterations in the microbial community of shrimp intestine can facilitate the colonization of pathogenic bacteria (Holt *et al.*, 2021). It has become an established fact that the gut microbiome is closely interconnected to the immune system of host (Sekirov *et al.*, 2010) and a depletion in microbial diversity is often predicted to be the chief reason for pathogenesis (Holt *et al.*, 2021).

PHB supplementation has been reported to increase the abundance of beneficial microflora in the intestine (Qiao *et al.*, 2020). *Mesorhizobium* is a crucial bacterium for sustaining the normal growth of shrimp and its absence has been found to cause imbalance in the intestinal flora of starved shrimp (Dai *et al.*, 2018). PHB diets has been proven to increase the abundance of this bacterium in gibel carp, (Qiao *et al.*, 2020) and hence can be expected to show similar results in shrimp as well. The microbiome modulation activity of PHB diet could be because of the fact that PHB gets monomerized to SCFA at intestine and SCFA can further promote the growth of probiotic bacteria in the intestine (Forchielli and Walker 2007). SCFA in the intestine also modulates immune response and metabolic output of the host (Rajeev *et al.*, 2021). Dietary supplementation of PHB was found to enrich the beneficial bacteria such as *Bacillus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium* and *Bdellovibrio* in *L. vannamei* (Duan *et al.*, 2017). Another study proved that amorphous PHB extracted from *Halomonas* sp. enriched the symbiotic

microbial population of shrimp intestine and decreased the abundance of *Vibrio* sp. much lower than crystalline PHB (Gao *et al.*, 2019).

Conclusion

The extensive use of antibiotics in shrimp aquaculture has led to the emergence of antibiotics resistance, and this calls for an alternative disease treatment strategy. Biopolymers due to their biodegradable nature is a suitable eco-friendly option. The use of PHB in shrimp disease management is of huge interest these days due to its anti-pathogenic and immune stimulating abilities. PHB exerts its activity by microbial or enzymatic degradation into β -hydroxybutyric acid which is known for its anti-infective and immune stimulating activities. Marine PHB producing microbes are found to be a great source of PHB when compared to chemically synthesized PHB. The use of PHB also positively modulates gut microbiome composition of the shrimp. However, the exact mechanism of PHB degradation and its antimicrobial effect is still unclear. Therefore, further research is required to understand the exact mechanism of PHB degradation. The use other biopolymers for disease treatment in aquaculture could also be studied, which would provide better environmental friendly treatment options. Therefore, the use of PHB could be better alternative to harmful antibiotics in shrimp disease management.

References

- Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews*, 54(4), 450-472.
- Arun, A., Arthi, R., Shanmugabalaji, V., & Eyini, M. (2009). Microbial production of poly- β -hydroxybutyrate by marine microbes isolated from various marine environments. *Bioresource technology*, 100(7), 2320-2323.
- Asche, F., Anderson, J. L., Botta, R., Kumar, G., Abrahamsen, E. B., Nguyen, L. T., & Valderrama, D. (2021). The economics of shrimp disease. *Journal of invertebrate pathology*, 186, 107397.
- Asiri, F., & Chu, K. H. (2020). A Novel Recirculating Aquaculture System for Sustainable Aquaculture: Enabling Wastewater Reuse and Conversion of Waste-to-Immune-Stimulating Fish Feed. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(49), 18094-18105.
- Baruah, K., Huy, T. T., Norouzitallab, P., Niu, Y., Gupta, S. K., De Schryver, P., & Bossier, P. (2015). Probing the protective mechanism of poly- β -hydroxybutyrate against vibriosis by using gnotobiotic *Artemia franciscana* and *Vibrio campbellii* as host-pathogen model. *Scientific reports*, 5(1), 1-8.
- Chen, G. Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry. *Chemical Society Reviews*, 38(8), 2434-2446.
- Chen, G. Q., & Wu, Q. (2005a). Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(5), 592-599.
- Chen, G. Q., & Wu, Q. (2005b). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26(33), 6565-6578.
- Chien, C. C., Chen, C. C., Choi, M. H., Kung, S. S., & Wei, Y. H. (2007). Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio* spp. isolated from marine environment. *Journal of Biotechnology*, 132(3), 259-263.
- Cui, P., Zhou, Q. C., Huang, X. L., & Xia, M. H. (2016). Effect of dietary vitamin B6 on growth, feed utilization, health and non-specific immune of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 22(5), 1143-1151.
- Dai, W. F., Zhang, J. J., Qiu, Q. F., Chen, J., Yang, W., Ni, S., & Xiong, J. B. (2018). Starvation stress affects the interplay among shrimp gut microbiota, digestion and immune activities. *Fish & shellfish immunology*, 80, 191-199.
- Daniel, H., Gholami, A. M., Berry, D., Desmarchelier, C., Hahne, H., Loh, G., ... & Clavel, T. (2014). High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *The ISME journal*, 8(2), 295-308.
- De Schryver, P., Sinha, A. K., Kunwar, P. S., Baruah, K., Verstraete, W., Boon, N., ... & Bossier, P. (2010). Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), 1535-1541.
- De Schryver, P., Sinha, A. K., Kunwar, P. S., Baruah, K., Verstraete, W., Boon, N., ... & Bossier, P. (2010). Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), 1535-1541.

- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2009). Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnology advances*, 27(6), 680-685.
- Defoirdt, T., Halet, D., Vervaeren, H., Boon, N., Van de Wiele, T., Sorgeloos, P., ... & Verstraete, W. (2007). The bacterial storage compound poly- β -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environmental microbiology*, 9(2), 445-452.
- Defoirdt, T., Halet, D., Vervaeren, H., Boon, N., Van de Wiele, T., Sorgeloos, P., ... & Verstraete, W. (2007). The bacterial storage compound poly- β -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environmental microbiology*, 9(2), 445-452.
- Dobrowolska, J., Zagrodzki, P., Woźniakiewicz, M., Woźniakiewicz, A., Zwolińska, M., Winnicka, D., & Paško, P. (2016). Procedure optimization for extracting short-chain fatty acids from human faeces. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 124, 337-340.
- Duan, Y., Zhang, Y., Dong, H., Wang, Y., & Zhang, J. (2017). Effects of dietary poly- β -hydroxybutyrate (PHB) on microbiota composition and the mTOR signaling pathway in the intestines of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of microbiology*, 55(12), 946-954
- Forchielli, M. L., & Walker, W. A. (2005). The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *British Journal of Nutrition*, 93(S1), S41-S48.
- Gao, M., Du, D., Bo, Z., & Sui, L. (2019). Poly- β -hydroxybutyrate (PHB)-accumulating *Halomonas* improves the survival, growth, robustness and modifies the gut microbial composition of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture*, 500, 607-612.
- Gopi, K., Balaji, S., & Muthuvelan, B. (2014). Isolation purification and screening of biodegradable polymer PHB producing cyanobacteria from marine and fresh water resources. *Iran. J. Energy Environ*, 5, 94-100.
- Gowda, V., & Shivakumar, S. (2019). Novel biocontrol agents: short chain fatty acids and more recently, polyhydroxyalkanoates. In *Biotechnological applications of polyhydroxyalkanoates* (pp. 323-345). Springer, Singapore.
- Halet, D., Defoirdt, T., Van Damme, P., Vervaeren, H., Forrez, I., Van de Wiele, T., ... & Verstraete, W. (2007). Poly- β -hydroxybutyrate-accumulating bacteria protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *FEMS microbiology ecology*, 60(3), 363-369.
- Holt, C. C., Bass, D., Stentiford, G. D., & van der Giezen, M. (2021). Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. *Journal of invertebrate pathology*, 107387.
- Hong, J. W., Song, H. S., Moon, Y. M., Hong, Y. G., Bhatia, S. K., Jung, H. R., ... & Yang, Y. H. (2019). Polyhydroxybutyrate production in halophilic marine bacteria *Vibrio proteolyticus* isolated from the Korean peninsula. *Bioprocess and biosystems engineering*, 42(4), 603-610.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211(4), 213-236.
- Joseph, T. C., Murugadas, V., Reghunathan, D., Shaheer, P., Akhlnath, P. G., & Lalitha, K. V. (2015). Isolation and characterization of *Vibrio cholerae* O139 associated with mass mortality in *Penaeus monodon* and experimental challenge in postlarvae of three species of shrimp. *Aquaculture*, 442, 44-47.

- Kavitha, G., Rengasamy, R., & Inbakandan, D. (2018). Polyhydroxybutyrate production from marine source and its application. *International journal of biological macromolecules*, *111*, 102-108.
- Kiran, G. S., Priyadharshini, S., Dobson, A. D., Gnanamani, E., & Selvin, J. (2016). Degradation intermediates of polyhydroxy butyrate inhibits phenotypic expression of virulence factors and biofilm formation in luminescent *Vibrio* sp. PUGSK8. *NPJ biofilms and microbiomes*, *2*, 16002.
- Kiran, G. S., Priyadharshini, S., Sajayan, A., Ravindran, A., Priyadharshini, G. B., Ramesh, U., ... & Selvin, J. (2020). Dietary administration of gelatinised polyhydroxybutyrate to *Penaeus vannamei* improved growth performance and enhanced immune response against *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, *517*, 734773.
- Kumar, B. K., Deekshit, V. K., Raj, J. R. M., Rai, P., Shivanagowda, B. M., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2014). Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. *Aquaculture*, *433*, 247-251.
- Lai, H. C., Ng, T. H., Ando, M., Lee, C. T., Chen, I. T., Chuang, J. C., ... & Wang, H. C. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish & shellfish immunology*, *47*(2), 1006-1014.
- Laranja, J. L. Q., & Bossier, P. (2020). Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) and infection reduction in farmed aquatic animals. *Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids*, 457-482.
- Laranja, J. L. Q., Amar, E. C., Ludevese-Pascual, G. L., Niu, Y., Geaga, M. J., De Schryver, P., & Bossier, P. (2017). A probiotic *Bacillus* strain containing amorphous poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) stimulates the innate immune response of *Penaeus monodon* postlarvae. *Fish & shellfish immunology*, *68*, 202-210.
- Laranja, J. L. Q., Ludevese-Pascual, G. L., Amar, E. C., Sorgeloos, P., Bossier, P., & De Schryver, P. (2014). Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) accumulating *Bacillus* spp. improve the survival, growth and robustness of *Penaeus monodon* postlarvae. *Veterinary microbiology*, *173*(3-4), 310-317.
- Lee, S. Y. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in biotechnology*, *14*(11), 431-438.
- Lenz, R. W., & Marchessault, R. H. (2005). Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*, *6*(1), 1-8.
- Liu, Y., De Schryver, P., Van Delsen, B., Maignien, L., Boon, N., Sorgeloos, P., ... & Defoirdt, T. (2010). PHB-degrading bacteria isolated from the gastrointestinal tract of aquatic animals as protective actors against luminescent vibriosis. *FEMS microbiology ecology*, *74*(1), 196-204.
- Liu, Y., De Schryver, P., Van Delsen, B., Maignien, L., Boon, N., Sorgeloos, P., ... & Defoirdt, T. (2010). PHB-degrading bacteria isolated from the gastrointestinal tract of aquatic animals as protective actors against luminescent vibriosis. *FEMS microbiology ecology*, *74*(1), 196-204.
- López-Cortés, A., Lanz-Landázuri, A., & García-Maldonado, J. Q. (2008). Screening and isolation of PHB-producing bacteria in a polluted marine microbial mat. *Microbial ecology*, *56*(1), 112-120.
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and molecular biology reviews*, *63*(1), 21-53.
- Mahendhran, K., Arthanari, A., Dheenadayalan, B., & Ramanathan, M. (2018). Bioconversion of oily bilge waste to polyhydroxybutyrate (PHB) by marine *Ochrobactrum* intermedium. *Bioresource Technology Reports*, *4*, 66-73.

- Matsusaki, H., Manji, S., Taguchi, K., Kato, M., Fukui, T., & Doi, Y. (1998). Cloning and molecular analysis of the poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *Journal of bacteriology*, 180(24), 6459-6467.
- Mohandas, S. P., Balan, L., Lekshmi, N., Cubelio, S. S., Philip, R., & Bright Singh, I. S. (2017). Production and characterization of polyhydroxybutyrate from *Vibrio harveyi* MCCB 284 utilizing glycerol as carbon source. *Journal of applied microbiology*, 122(3), 698-707.
- Mohanrasu, K., Rao, R. G. R., Dinesh, G. H., Zhang, K., Sudhakar, M., Pugazhendhi, A., ... & Arun, A. (2021). Production and characterization of biodegradable polyhydroxybutyrate by *Micrococcus luteus* isolated from marine environment. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 125-134.
- Mostafa, Y. S., Alrumman, S. A., Alamri, S. A., Otaif, K. A., Mostafa, M. S., & Alfaify, A. M. (2020a). Bioplastic (poly-3-hydroxybutyrate) production by the marine bacterium *Pseudodonghicola xiamenensis* through date syrup valorization and structural assessment of the biopolymer. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.
- Mostafa, Y. S., Alrumman, S. A., Otaif, K. A., Alamri, S. A., Mostafa, M. S., & Sahlabji, T. (2020b). Production and characterization of bioplastic by polyhydroxybutyrate accumulating *Erythrobacter aquimaris* isolated from mangrove rhizosphere. *Molecules*, 25(1), 179.
- Mousavioun, P., George, G. A., & Doherty, W. O. (2012). Environmental degradation of lignin/poly (hydroxybutyrate) blends. *Polymer degradation and stability*, 97(7), 1114-1122.
- Orts, W. J., Nobes, G. A., Kawada, J., Nguyen, S., Yu, G. E., & Ravenelle, F. (2008). Poly (hydroxyalkanoates): biorefinery polymers with a whole range of applications. The work of Robert H. Marchessault. *Canadian Journal of Chemistry*, 86(6), 628-640.
- Patnaik, P. R. (2006). Dispersion optimization to enhance PHB production in fed-batch cultures of *Ralstonia eutropha*. *Bioresource technology*, 97(16), 1994-2001.
- Prathiviraj, R., Rajeev, R., Fernandes, H., Rathna, K., Lipton, A. N., Selvin, J., & Kiran, G. S. (2021). A gelatinized lipopeptide diet effectively modulates immune response, disease resistance and gut microbiome in *Penaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 112, 92-107.
- Qiao, G., Chen, P., Sun, Q., Zhang, M., Zhang, J., Li, Z., & Li, Q. (2020). Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) in bioflocs alters intestinal microbial community structure, immune-related gene expression and early Cyprinid herpesvirus 2 replication in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish & shellfish immunology*, 97, 72-82.
- Rajeev, R., Adithya, K. K., Kiran, G. S., & Selvin, J. (2021). Healthy microbiome: a key to successful and sustainable shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 238-258.
- Rajeev, R., Seethalakshmi, P. S., Jena, P. K., Prathiviraj, R., Kiran, G. S., & Selvin, J. (2021). Gut microbiome responses in the metabolism of human dietary components: Implications in health and homeostasis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-17.
- Ray, S., & Kalia, V. C. (2017). Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates. *Indian journal of microbiology*, 57(3), 261-269.
- Reusch, R. N. (1999). *Streptomyces lividans* potassium channel contains poly-(R)-3-hydroxybutyrate and inorganic polyphosphate. *Biochemistry*, 38(47), 15666-15672.

- Ricke, S. C. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry science*, 82(4), 632-639.
- Robohm, R. A. (1984). In vitro phagocytosis by molluscan hemocytes: a survey and critique of methods. In *Invertebrate Blood* (pp. 147-172). Springer, Boston, MA.
- Rojas-Morales, P., Tapia, E., & Pedraza-Chaverri, J. (2016). β -Hydroxybutyrate: A signaling metabolite in starvation response?. *Cellular signalling*, 28(8), 917-923.
- Rungrasamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., Chaiyapechara, S., Jiravanichpaisal, P., & Karoonuthaisiri, N. (2014). Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *PLoS one*, 9(3), e91853.
- Sasidharan, R. S., Bhat, S. G., & Chandrasekaran, M. (2015). Biocompatible polyhydroxybutyrate (PHB) production by marine *Vibrio azureus* BTKB33 under submerged fermentation. *Annals of microbiology*, 65(1), 455-465.
- Sathiyarayanan, G., Saibaba, G., Kiran, G. S., & Selvin, J. (2013). A statistical approach for optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus subtilis* MSBN17. *International journal of biological macromolecules*, 59, 170-177.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*.
- Selvin, J. (2010). *Shrimp Disease Management*. Ane Books Pvt Ltd.
- Simon-Colin, C., Ragu n s, G., Cozien, J., & Guezennec, J. G. (2008). *Halomonas profundus* sp. nov., a new PHA-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Journal of applied microbiology*, 104(5), 1425-1432.
- Situmorang, M. L., Suantika, G., Santoso, M., Khakim, A., Wibowo, I., & Aditiawati, P. (2020). Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) Improves Nursery-Phase Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Defense against Vibriosis. *North American Journal of Aquaculture*, 82(1), 108-114
- Sudesh, K., & Iwata, T. (2008). Sustainability of biobased and biodegradable plastics. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 36(5-6), 433-442.
- Suguna, P., Binuramesh, C., Abirami, P., Saranya, V., Poornima, K., Rajeswari, V., & Shenbagarathai, R. (2014). Immunostimulation by poly- β hydroxybutyrate–hydroxyvalerate (PHB–HV) from *Bacillus thuringiensis* in *Oreochromis mossambicus*. *Fish & shellfish immunology*, 36(1), 90-97.
- Tian, S. J., Lai, W. J., Zheng, Z., Wang, H. X., & Chen, G. Q. (2005). Effect of over-expression of phasin gene from *Aeromonas hydrophila* on biosynthesis of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate. *FEMS microbiology letters*, 244(1), 19-25.
- Tokiwa, Y., & Calabia, B. P. (2008). Biological production of functional chemicals from renewable resources. *Canadian Journal of Chemistry*, 86(6), 548-555.
- Van Cam, D. T., Van Hao, N., Dierckens, K., Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2009). Novel approach of using homoserine lactone-degrading and poly- β -hydroxybutyrate-accumulating bacteria to protect *Artemia* from the pathogenic effects of *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 291(1-2), 23-30.

- Van Hung, N., Bossier, P., Hong, N. T. X., Ludeseve, C., Garcia-Gonzalez, L., Nevejan, N., & De Schryver, P. (2019). Does *Ralstonia eutropha*, rich in poly- β hydroxybutyrate (PHB), protect blue mussel larvae against pathogenic vibrios?. *Journal of fish diseases*, 42(6), 777-787.
- Vroman, I., & Tighzert, L. (2009). Biodegradable polymers. *Materials*, 2(2), 307-344.
- Wegener, H. C., Aarestrup, F. M., Gerner-Smidt, P., & Bager, F. (1999). Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum*, 92, 51-57.
- Weitkunat, K., Schumann, S., Petzke, K. J., Blaut, M., Loh, G., & Klaus, S. (2015). Effects of dietary inulin on bacterial growth, short-chain fatty acid production and hepatic lipid metabolism in gnotobiotic mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 26(9), 929-937.
- Willis, C. (2000). Antibiotics in the food chain: their impact on the consumer. *Reviews in Medical Microbiology*, 11(3), 153-160
- Wu, H. A., Sheu, D. S., & Lee, C. Y. (2003). Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry. *Journal of microbiological methods*, 53(1), 131-135.
- Xu, W. J., & Pan, L. Q. (2012). Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. *Aquaculture*, 356, 147-152.

Proteínas y Péptidos de Residuos Líquidos Pesqueros: Obtención, Bioactividad y Uso en la Alimentación Acuícola

Emmanuel Martínez Montaña*, Jesús Aarón Salazar Leyva, Idalia Osuna Ruiz

Laboratorio de Compuestos Naturales Bioactivos

Unidad Académica de Ingeniería en Departamento de Biotecnología

Universidad Politécnica de Sinaloa

Mazatlán, Sinaloa, México

Tel: +52 669 166 1348, Email: emartinez@upsin.edu.mx

Resumen

La industria procesadora de productos pesqueros, derivado de sus actividades productivas, genera una importante cantidad de residuos líquidos, los cuales son comúnmente conocidos como efluentes pesqueros. Muchos de estos efluentes, son descargados al medio ambiente sin recibir algún tratamiento, generando un impacto negativo en los cuerpos de agua y zonas costeras donde son vertidos. Por otro lado, estudios han determinado que estos efluentes poseen concentraciones importantes de materia sólida, principalmente proteínas. Dicha proteína es de alta calidad considerando su perfil de aminoácidos, por lo cual es de interés emplear tecnologías para poder concentrarlas y recuperarlas. Una vez recuperada la fracción proteica de los efluentes pesqueros, a partir de esta se pueden obtener productos con alto valor agregado (p.ej. hidrolizados proteicos y péptidos bioactivos) aplicando tecnología enzimática. Las aplicaciones de estos nuevos productos en la industria alimentaria (humana o animal), pueden ser amplias y de importante valor económico. En esta revisión, se discutirá lo relacionado a alternativas de aprovechamiento de los efluentes generados en la industria pesquera, enfocándose en la recuperación y la utilización de fracciones proteicas. Se incluyen algunas técnicas empleadas para su obtención, mencionando sus ventajas y requerimientos; así como las propiedades tecno-funcionales y biológicas de las proteínas o sus hidrolizados proteicos obtenidos a partir de los efluentes pesqueros, y finalmente, se discutirá los usos y aplicaciones de efluentes pesqueros y sus hidrolizados como reemplazo de harina de pescado para la formulación de alimentos acuícolas, lo cual acarrea ventajas sobre el desempeño productivo y/o sobre distintos indicadores de la salud de los organismos.

Palabras clave: *Efluentes pesqueros; Hidrólisis enzimática; Propiedades bioactivas; Recuperación proteica; Suplemento alimenticio*

1. Introducción

La transformación de materias primas obtenidas de actividades pesqueras o acuícolas, en productos destinados para el consumo humano genera una gran cantidad de subproductos sólidos (cabezas, vísceras, piel, escamas, esqueletos, entre otros) que pueden llegar a representar entre un 30% a 70% en peso de la materia prima inicial (Bruno *et al.*, 2019). A la par de la generación de estos subproductos sólidos, grandes volúmenes de residuos líquidos (5 a 40 m³/ tonelada de material procesado; Venugopal y Sasidharan, 2021) conocidos como efluentes también son generados durante operaciones como el lavado, descongelado, fileteado, salmuero y cocción de los organismos, así como durante la producción de harina de pescado (Navarro-Peraza *et al.*, 2020). Estos efluentes contienen materia orgánica en forma soluble y en estado coloidal, cuya carga depende del tipo de proceso en el que se generaron. El manejo más común de estos efluentes, cuando son recuperados, consiste en su condensación o deshidratación, inclusión en harinas de pescado y su posterior utilización para la fabricación de alimentos para animales; sin embargo, gran proporción de estos efluentes son dispuestos de manera inadecuada hacia el ambiente descargándolos directamente a cuerpos de agua aledaños a las plantas procesadoras, en donde ocasionan serios problemas ecológicos (Venugopal y Sasidharan, 2021), principalmente procesos de eutrofización, debido a su elevada carga de materia orgánica, demanda bioquímica de oxígeno y alto contenido de sales (Aanand *et al.*, 2017).

En este sentido, los efluentes deben ser sometidos a un tratamiento que reduzca a un mínimo permisible los niveles de materia orgánica presente en ellos, para luego disponer la fracción acuosa al ambiente; sin embargo, estos procedimientos implican un costo adicional de procesamiento. Numerosas investigaciones constatan que los efluentes derivados del procesamiento de productos pesqueros son una abundante fuente de proteínas, lípidos y cenizas. Pero también están presentes en ellos moléculas con propiedades funcionales y bioactivas tales como péptidos, nucleótidos y pigmentos (p.ej. astaxantina y carotenoides), todos estos de interés para la industria alimentaria (Amado *et al.*, 2016) y farmacéutica (Hung *et al.*, 2014; Kasiwut *et al.*, 2019), principalmente. Por lo que la recuperación de la materia orgánica presente en los efluentes pesqueros podría reducir los costos de su tratamiento, además que la recuperación de la fracción proteica soluble de estos efluentes representa una estrategia atractiva para la generación de nuevos productos de interés industrial con valor agregado (Navarro-Peraza *et al.*, 2020; Venugopal, 2021) (Figura 1).

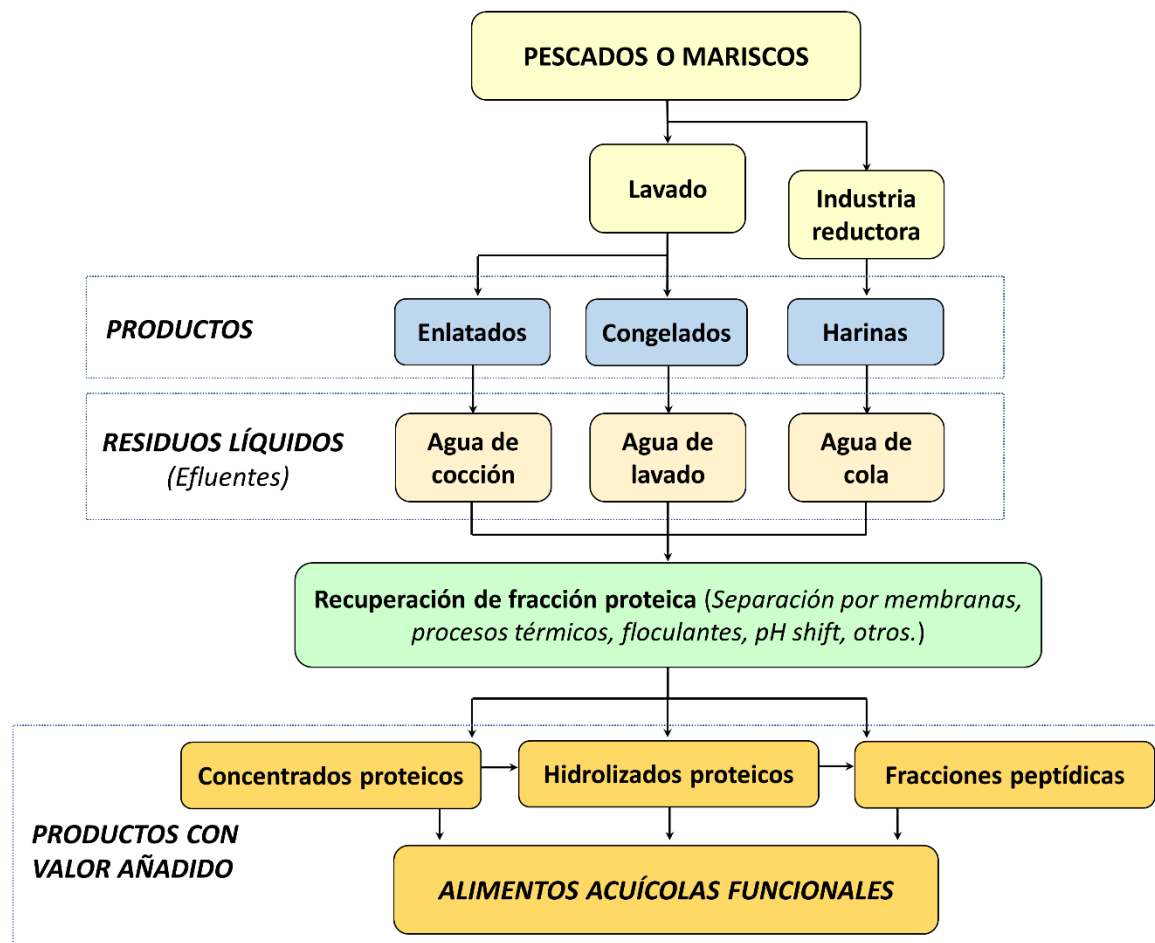


Figura 1. Obtención de compuestos proteicos con valor añadido a partir de efluentes pesqueros y su potencial uso como ingredientes para la elaboración de alimentos acuícolas funcionales (Modificado de Navarro-Pedraza *et al.*, 2020).

A continuación, se describen brevemente dos de los efluentes pesqueros (agua de cocción y agua de cola) con los cuales nuestro grupo de investigación ha trabajado, y a partir de los cuales se ha recuperado moléculas de origen proteico con interés alimenticio.

Agua de cocción: Las industrias procesadoras de productos pesqueros tales como las enlatadoras de especies de túnidos (p.ej. atún aleta amarilla), pelágicos menores (p.ej. sardina y anchoveta) y moluscos (p.ej. abulón y mejillón), por mencionar algunos ejemplos, generan distintos tipos de efluentes, durante las operaciones de lavado, descongelado y cocción. Esta última operación unitaria, genera el mayor volumen de un efluente conocido como “agua o jugo de

cocción”. A manera de ejemplo, los túnidos, son cocinados enteros a vapor, a temperaturas que oscilan entre los 96 y 105° C, de 4 a 6 horas, dependiendo del tamaño de los peces (Gómez *et al.*, 2016). Así, se ha reportado que el agua de cocción derivada de este proceso puede contener entre un 3.9 a 5% de proteína (Hung *et al.*, 2014; Martínez-Montaña *et al.*, 2021b). También se ha reportado, que el agua de cocción de anchoveta (*Engraulis japonicus*) es un importante efluente, ya que, durante el procesamiento de esta especie, se generan aproximadamente 1.5 toneladas de agua de cocción, por cada tonelada de pescado procesado y se ha encontrado que este efluente es fuente de proteína altamente nutritiva, pues contiene aproximadamente 5 % de proteína cruda con un 57 % de aminoácidos (AAs) esenciales (Tang *et al.*, 2015).

Además de la generación de aguas de cocción de pescado, el cocimiento de crustáceos, tales como camarón y jaibas, es otra fuente importante. A manera de ejemplo, Pérez-Santín, *et al.*, (2013) determinaron la composición proximal del efluente proveniente de la cocción de camarón (*Penaeus spp.*), encontrando que la fracción proteica fue el componente mayoritario del jugo de cocción (26.2 g/L), y que dicha fracción representaba el 53 % del total de la materia seca.

En el caso de la industria procesadora de moluscos tales como los mejillones, el tratamiento térmico industrial de mitílidos genera grandes volúmenes de efluentes. Se ha estimado que la cocción industrial de mejillones genera entre 300 y 400 L de efluentes/tonelada de carne procesada (Prieto *et al.*, 2015), siendo dichos residuos líquidos comúnmente dispuestos en el mar sin un tratamiento previo. La carga orgánica de los efluentes derivados del procesamiento de mitílidos depende de la operación unitaria involucrada. Así, los efluentes generados en las etapas de lavado y desconchado poseen una baja carga orgánica; sin embargo, la etapa de cocción genera efluentes con una alta carga orgánica (Medina-Uzcátegui *et al.*, 2021). Se ha reportado que aguas con alta carga orgánica contienen 5.08% de sólidos totales, de los cuales 50.32% es materia orgánica y el restante 49.68% son compuestos inorgánicos (Bello-Bugallo *et al.*, 2012). Los principales componentes de la materia orgánica presente en los efluentes derivados de la cocción de mitílidos son el glicógeno y la taurina

Agua de cola: En el año 2018, la producción mundial pesquera alcanzó unos 179 millones de toneladas, de los cuales 22.2 millones de toneladas fue destinada a usos no alimentarios y el 82% de esta cantidad (18 millones de toneladas) se transformó en harina y aceite por la industria pesquera reductora (FAO, 2020). El “agua de cola” es uno de los efluentes generados durante la

fabricación de harina y aceite de pescado. Para la elaboración de estos dos últimos productos, la materia prima (peces pelágicos menores o subproductos sólidos pesqueros) es cocida, molida, prensada y secada. La fase líquida resultante del prensado se compone principalmente de agua y aceite, los cuales son separados a través de un proceso de centrifugación. Una vez que el aceite es removido, el efluente obtenido es conocido comúnmente como agua de cola (AC). Este efluente es de gran interés, ya que posee en promedio 8 a 11 % de sólidos totales, de los cuales el principal componente son las proteínas y los lípidos quienes representan entre un 3 a 6% y un 2 a 5% de la masa total del AC, respectivamente, porcentajes que dependen de la materia prima utilizada (Valdez-Hurtado *et al.*, 2018). En el caso de AC generada durante la elaboración de harina de pescado usando sardina crinuda como materia prima, las proteínas representan entre el 4.5 y 5.9% de la masa total húmeda (Martínez-Montaña *et al.*, 2021a, b), dependiendo de la temporada de captura, condiciones de almacenaje o intensidad de la centrifugación para separar la fracción lipídica. Se ha estimado que, sólo en el estado de Sonora, 120 mil toneladas de AC son generadas debido a la transformación de aproximadamente 20 mil toneladas de sardina en harina de pescado. Con esto, al menos 3,600 toneladas de proteína podrían ser recuperadas de AC de sardina Monterey y 5,000 toneladas de AC de sardina crinuda (Valdez-Hurtado *et al.*, 2018).

Actualmente, la industria reductora recupera los sólidos solubles del AC a través de un proceso de condensación de sólidos solubles y su reincorporación a la fracción sólida obtenida durante el proceso de prensado, lo cual aumenta el rendimiento en la producción de harina. Sin embargo, en algunas ocasiones ante la falta de equipamiento suficiente para las operaciones de concentración y secado, la industria descarga el AC directamente a las zonas costeras aledañas a las plantas procesadoras (Pacheco-Aguilar, *et al.*, 2018).

2. Estrategias aplicadas para la obtención de proteínas y péptidos a partir de efluentes pesqueros.

En general, el procesamiento de los alimentos, tiene como resultado la generación de elevados volúmenes de aguas residuales o efluentes, los cuales contienen compuestos con alto valor nutricional (Venugopal y Sasidharan, 2021). En este sentido, el procesamiento de organismos marinos genera una importante cantidad de efluentes, los cuales, como se mencionó anteriormente, poseen diferentes cantidades de proteínas solubles que pueden ser recuperadas y concentradas por

distintas estrategias y/o empleadas como ingredientes funcionales o materia prima para la producción de hidrolizados de proteína.

Los efluentes provenientes de las industrias procesadoras de recursos pesqueros poseen concentraciones de sólidos en un rango aproximado de 8 a 10% del peso húmedo, de los cuales las proteínas son el principal componente (llegando a representar hasta el 70% de los sólidos totales). Así, se han reportado distintas estrategias para recuperar y/o concentrar la fracción proteica de los efluentes pesqueros, destacando el uso de ácidos y bases (método pH-shift), aplicación de agentes floculantes (polisacáridos principalmente), la tecnología de membranas (ultrafiltración y nanofiltración) y la hidrólisis enzimática (Navarro-Peraza, *et al.*, 2020). A continuación, se describe de manera breve el fundamento de cada una de estas estrategias, y se presentan ejemplos de su aplicación para el aislamiento de proteínas y péptidos de efluentes pesqueros.

Método del pH-shift: Los ácidos y bases son agentes precipitantes efectivos en la recuperación de proteínas en solución acuosa. Considerando que, en una molécula anfótera, a un valor de pH determinado su carga electrostática puede ser igual a 0 (punto isoelectrico o pI), las moléculas de origen proteico pueden llegar a ser insolubles en agua debido a que la atracción hidrofóbica proteína-proteína es mayor que la atracción electrostática proteína-agua, resultando en una precipitación isoelectrica. Por el contrario, cuando el pH se ajusta lejos del pI de la proteína, la interacción proteína-agua se favorece, lo que resulta en una solubilización isoelectrica. Con este proceso de solubilización/precipitación isoelectrica, primero, se favorece la solubilización proteica con el objetivo de separar estas de lípidos y otros materiales insolubles. Posterior a la solubilización proteica y tras un ajuste de pH (pH-shift), se induce su precipitación y su recuperación mediante un proceso de centrifugación. Para moléculas de origen proteico, una solubilización se da a pH alcalinos (pH 10.5-13.0) o ácidos (pH 1.5-3.0) y la precipitación a un pH cercano a 5.5 (Matak *et al.*, 2015).

Uso de polisacáridos como agentes floculantes: De manera tradicional, muchas industrias pesqueras utilizan cloruro férrico, sulfato de aluminio e hidróxido de calcio para lograr la floculación de proteínas contenidas en los efluentes, obteniendo buenos resultados gracias a que las partículas suspendidas se desestabilizan y pueden ser recuperadas ya sea por procesos de filtración y centrifugación (Fahim *et al.*, 2001; Taskaya & Jaczynski, 2009); sin embargo, el uso de los agentes floculantes antes mencionados ha sido cuestionado por la probable presencia de iones metálicos en la fracción proteica, que por cuestiones de seguridad, limitaría su aplicación

como ingredientes alimentarios en animales y humanos. En este contexto, se han utilizado polisacáridos de origen natural, como una alternativa para flocular proteínas contenidas en efluentes pesqueros, basándose en el hecho de que los polisacáridos cargados negativamente, pueden interactuar con las proteínas a valores de pH en los cuales su carga neta es positiva o cercana a la neutralidad (Ye, 2008). La efectividad, cantidad requerida y especificidad de los polisacáridos para flocular proteínas, depende de diversos factores, tales como la densidad de carga, peso molecular y presencia de grupos carboxilo y sulfato en la estructura del polisacárido (Forghani *et al.*, 2020).

Tecnología de membranas: Esta estrategia, consiste en el uso de presión hidrostática para forzar un líquido a través de una membrana semipermeable. Al fluido que cruza a través de la membrana, se le conoce como “permeado” y el líquido que permanece en la membrana es el “retenido” (Kumar *et al.*, 2013). Las membranas utilizadas se componen principalmente de materiales sintéticos, tales como celulosa, poli amidas y poli sulfonas, permitiendo así la concentración y separación de componentes proteicos que se encuentran en solución, en base a su peso molecular y sin causar desnaturalización térmica de los mismos (Lee *et al.*, 2014). Los tamaños de poro de las membranas se encuentran en el rango de 0.1 a 5000 nm y se clasifican de acuerdo con el tamaño de partícula que pueden separar. Por ejemplo, la microfiltración separa partículas de 50 nm o mayores; la ultrafiltración (UF) separa partículas de alrededor de 3 nm o mayores; la nanofiltración (NF) separa partículas de 1 nm o de mayor tamaño; y la osmosis inversa logra separar partículas menores a 0.1 nm (Calabrò & Basile, 2011).

Hidrólisis enzimática: Los hidrolizados proteicos (HP) se definen como una mezcla de péptidos que contienen generalmente de 2 a 20 AAs, y son producidos a través de la hidrólisis de proteínas, realizada ya sea por métodos químicos (empleando ácidos o álcalis fuertes) o por métodos biológicos (como los fermentativos y enzimáticos); la hidrólisis enzimática es la más utilizada, ya que es un proceso que no utiliza compuestos químicos tóxicos y que además preserva las propiedades nutricionales y funcionales de las fuentes proteicas. Adicionalmente, la principal ventaja del uso de enzimas es que las temperaturas de hidrólisis son moderadas, y además la especificidad hidrolítica de las enzimas, permite un mejor rendimiento y control del grado de hidrólisis. Este último parámetro indica el porcentaje de los enlaces peptídicos escindidos durante el proceso y es uno de los factores más importantes que determina las propiedades funcionales de los HP obtenidos (Tavano, 2013). Son diversos los factores que influyen en el proceso de hidrólisis

enzimática, por lo que estos, deben ser cuidadosamente controlados por el fabricante, para que así se obtengan hidrolizados proteicos con las propiedades fisicoquímicas requeridas para su aplicación. Entre los factores de mayor importancia, se encuentra el tipo de enzima y la fuente de proteína (sustrato). Existe una gran variedad de enzimas proteolíticas disponibles comercialmente para la obtención de hidrolizados de proteína, las cuales pueden provenir de fuentes animales (pancreatina, tripsina y pepsina), vegetales (papaína, bromelina) y microbianas (Alcalasa® y flavourzyme®). La elección de la enzima depende de la fuente de proteína y de los requerimientos de uso finales del hidrolizado (Pasupuleti y Braun, 2008).

A continuación, en la tabla 1 se presentan estudios científicos en los que se han aplicado las estrategias antes mencionadas para obtener proteínas y péptidos a partir de diversos efluentes de la industria pesquera.

Tabla 1. Estrategias para la obtención de proteínas y péptidos a partir de efluentes pesqueros.

Efluente pesquero	Estrategia de aislamiento de fracción proteica	Características químico-composicionales de proteínas y/o péptidos	Referencia
Agua de cola de sardina crinuda (<i>Opisthonema libertate</i>) y agua de cocción de atún aleta amarilla (<i>Thunnus albacares</i>)	Método del pH-shift; se utilizó ácido clorhídrico (HCl) y ácido tricloroacético como agentes precipitantes.	De manera específica, la recuperación de proteína fue efectiva (> 80%) solo para el agua de cola de sardina, al utilizar ambos ácidos. Se observó un incremento en los péptidos de alto peso molecular (17 a 158 kDa) en los sólidos recuperados de ambos efluentes y se incrementó la concentración de AAs esenciales, tales como Lys, Leu, Ile, Phe y Val.	(Martínez-Montaña <i>et al.</i> , 2021a).
Agua de cocción de camarón (<i>Pandalus borealis</i>)	Floculación utilizando polisacáridos grado alimenticio (carragenanos, alginatos y carboximetilcelulosa).	Se logró sedimentar con mayor efectividad la proteína del efluente (86 %) al utilizar carragenanos a una concentración de 0.45 g/L y pH 4.	(Forghani <i>et al.</i> , 2020)
Agua de cocción de camarón (no se especifica especie)	Acoplamiento de ultrafiltración (UF) e hidrólisis enzimática; la proteína del efluente fue inicialmente concentrada con UF y posteriormente se hidrolizó con la enzima alcalasa.	La concentración de proteína del efluente después de la UF, fue de 0.301 g/100 g, representando un factor de concentración de 3.2. El grado de hidrólisis más elevado fue de 45% tras 350 min de reacción. Los AAs encontrados en mayor proporción en el hidrolizado de proteína fueron Glu, Arg y Asp (15.12, 8.14 y 7.97 g/100 g, respectivamente).	(Tonon <i>et al.</i> , 2016)
Agua de cola de sardina crinuda (<i>Opisthonema libertate</i>)	Hidrólisis enzimática aplicando la enzima Alcalasa®	El contenido de proteína de los hidrolizados de agua de cola de sardina oscilo entre 56.6 y 63.3%. Los péptidos de peso molecular menor a 1.35 kDa, predominaron en los hidrolizados de proteína (47-62 % del total de péptidos). Los aminoácidos His, Lys, Met, Tau, Tyr y Trp (asociados a la impartición de sabores) fueron detectados en el efluente sin procesar y en los hidrolizados de proteína; este hallazgo vislumbra el potencial de aplicación de efluentes pesqueros en dietas acuícolas.	(Martínez-Montaña <i>et al.</i> , 2021b)

3. Propiedades tecno funcionales y biológicas de compuestos proteicos en los efluentes pesqueros.

Existen un número importante de reportes que dan cuenta del potencial que tienen los organismos acuáticos como fuente de compuestos proteicos cuyas propiedades tecno funcionales y/o biológicas, supone su potencial aplicación como ingrediente o suplemento en alimentación acuícola. Si bien, la mayoría de los trabajos se centran en subproductos sólidos de proteínas recuperadas y/o hidrolizadas (Girgih *et al.*, 2015; Greyling *et al.*, 2020) o bien sometidas a fermentación (Marti-Quijal *et al.*, 2020), existen algunas investigaciones que revelan que los subproductos líquidos o efluentes generados durante el procesamiento de distintas especies acuáticas, contienen fracciones de proteína con alguna bioactividad (y/o funcionalidad tecnológica) o bien servir como fuente de material proteico susceptible de ser empleado como ingrediente de valor nutricional o como materia prima para obtener hidrolizados bioactivos, que por sus características puedan ser adicionados en dietas acuícolas (Martínez-Montañaño *et al.*, 2021a).

En este sentido, se han estudiado las características fisicoquímicas y funcionales de las proteínas recuperadas de diferentes efluentes residuales del procesamiento de surimi (SPW) y sanguazas del sacrificio del (FSW) pescado, observando que las proteínas recuperadas poseen un elevado contenido de AAs esenciales principalmente leucina (Bethi *et al.*, 2020). Estos efluentes también poseen proteínas siendo predominantes las miofibrilares para SPW y hemoglobinas para FSW, donde las primeras exhibieron una mayor capacidad de retención de agua y espumante, mientras que las segundas mostraron una mejor propiedad emulsionante (Bethi *et al.*, 2020). Por su parte, Martínez-Montañaño *et al.* (2021a) recuperaron mediante cambios de pH (pH shift) compuestos proteicos presentes en agua de cocción de atún y agua de cola de sardina, logrando identificar la presencia de AAs esenciales y actividad antioxidante *in vitro* (ABTS y FRAP). Además, Vázquez-Sánchez *et al.* (2021) demostraron que las proteínas aisladas por liofilización de agua de lavado generadas durante la producción de tilapia picada (*Oreochromis niloticus*), poseen un elevado contenido de AAs esenciales, elevada solubilidad en agua y una destacable propiedad espumante en un amplio rango de pH, así como actividad antioxidante *in vitro* medida por el barrido del 50% de los radicales (IC₅₀) ABTS y DPPH en la prueba, obteniendo valores de IC₅₀ de 17.46 y 8.58 mg/mL, respectivamente. En otro estudio se evaluó la recuperación de proteínas, las

propiedades funcionales y la actividad biológica del agua de proceso hervida y al vapor generada a partir de la preparación de huevas concentradas de lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), bonito (*Katsuwonus pelamis*) y atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*), mediante el proceso de cocción en seco, encontrando que éstas poseen una buena capacidad espumante y emulsionante, así como actividad antioxidante medida por DPPH y ABTS. En cambio, las proteínas recuperadas al vapor mostraron actividad antihipertensiva medida por la capacidad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), siendo mayor dicha actividad en el lenguado japonés con un IC₅₀ de 1.04 mg/mL (Yoon *et al.*, 2017). Usando estos mismos efluentes, pero sometidos a un proceso de precipitación y solubilización isoeléctrica, Lee *et al.*, (2017) obtuvieron la mejor actividad inhibidora de ECA en bonito (IC₅₀ = 1.52 mg/ml) y un mayor poder reductor y actividad de tipo superóxido dismutasa para lenguado japonés. Por su parte, Mahdabi y Shekarabi (2018) evaluaron las características funcionales y propiedades antioxidantes de hidrolizados proteicos de harina y agua de cola de anchoveta (*Clupeonella sp.*). En dicho estudio se encontró que el agua de cola poseía potencial de aplicación, ya que los HP obtenidos de ésta exhibieron actividad antioxidante (con IC₅₀ de 1.3 y 1.5 mg/mL para la eliminación de radicales DPPH y ABTS, respectivamente), una elevada solubilidad a pH neutro (93 %) y una baja viscosidad (lo que resulta deseable en algunos procesos industriales como bombeo y extrusión), además de poseer habilidad para inhibir la oxidación lipídica. Así mismo, Tremblay *et al.*, (2020) mediante ultrafiltración obtuvieron un concentrado de proteínas a partir de aguas de cocción del cangrejo azul de las nieves (*Chionoectes opilio*), el cual además de poseer un buen contenido de AAs esenciales exhibió actividad antioxidante *in vitro* (medida por ORAC y DPPH) así como una buena capacidad de retención de aceite (1432 g de aceite por kg de muestra).

Si bien, los efluentes de la industria pesquera pueden contener *per se*, fracciones peptídicas con actividad biológica generados durante el procesamiento, ser recuperados y ser luego utilizados, muchos autores han logrado incrementar su potencial bioactivo mediante hidrólisis química, biológica o enzimática. Así, hidrolizados proteicos han sido producidos a partir de concentrados proteicos recuperados por ultrafiltración (MWCO de 30 y 10 kDa) de los efluentes generados en el procesamiento de la sepia (*Illex argentinus*), los cuales antes de ser hidrolizados ya exhibían actividad antihipertensiva y antioxidante, pero dichas

propiedades se incrementaron significativamente tras el proceso de hidrólisis (Amado *et al.*, 2013). Además, fue posible obtener por ultrafiltración fracciones menores a 1 kDa con actividad antihipertensiva (inhibición de ECA), en el que se encontraron péptidos que poseen en sus secuencias al menos un aminoácido hidrófobo y/o una prolina junto con residuos cargados positivamente en al menos una de las tres posiciones C-terminales (Amado *et al.*, 2014).

En otro estudio, en el cual se empleó como materia prima el agua de cocción de atún y realizando una hidrólisis proteica con proteasas obtenidas de *Aspergillus oryzae*, se lograron obtener productos con actividad antioxidante de los cuales se identificó la secuencia de 5 péptidos bioactivos con pesos moleculares del orden de 0.4 a 1 kDa, con capacidad de eliminación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Jao y Co, 2002). Además, a partir de concentrados de proteína obtenidos por ultrafiltración secuencial de agua de cocción de camarón, han sido producido hidrolizados con una potente actividad ACE-inhibitoria (con IC₅₀ de 1.98, 9.87 y 23.10 µg/mL para fracciones de 300,100 y 30 kDa, respectivamente) y actividad blanqueo de betacaroteno (Amado *et al.*, 2016).

En un estudio reciente, aguas residuales de la perca del Nilo (*Lates niloticus*) han sido tratadas con *Bacillus* para producir hidrolizados proteicos, aislando una fracción menor a 2 kDa que exhibió actividad antimicrobiana sobre *Vibrio vulnificus* (CMI= 585 µg/mL), así como valores de IC₅₀ de 0.43 y 0.22 mg/mL para las pruebas antioxidantes con DPPH y ABTS, respectivamente (Mhina *et al.*, 2020)

4. Uso de proteínas o péptidos de efluentes pesqueros en la elaboración de dietas acuícolas.

A la fecha, el principal uso que se les da a proteínas, concentrados, hidrolizados y fracciones peptídicas obtenidas a partir de efluentes como de subproductos sólidos derivados de las industrias procesadoras pesqueras, es como ingredientes o suplementos alimenticios para la elaboración de dietas tanto para animales terrestres (como ganado, aves y mascotas) como para especies acuáticas. Considerando que los efluentes pesqueros poseen diferentes tipos de moléculas y partículas solubles en agua (por ejemplo, aminoácidos libres, péptidos y compuestos de bajo peso molecular tales como la taurina, creatinina, carnosina, etc.), su potencial bioactivo, al igual que el de sus derivados es alto. Uno los principales componentes

presentes en efluentes tales como el AC y sanguaza, es la taurina (Tau) (Martínez-Montaña *et al.*, 2021b) el cual, al ser un aminoácido libre no proteínogénico, se encuentra en altas concentraciones en fluidos corporales y algunos órganos. La producción de Tau se destina principalmente para la elaboración de alimento para gatos, fórmulas infantiles y bebidas energéticas; a su vez, existen reportes que mencionan que la incorporación de Tau en alimentos formulados para peces promueve el buen desarrollo y salud del sistema gastrointestinal y posee características citoprotectoras al reducir niveles de peroxidación lipídica en los organismos a los cuales se les suministra (Salze y Davis, 2015).

Efluentes tales como el AC, son a su vez una fuente potencial de AAs esenciales debido a las altas concentraciones que poseen de estos. Se ha estimado que, a partir de 120 000 ton de AC derivadas de la elaboración de harina de pescado en Sonora, México, 6 840 ton de AAs esenciales podrían ser recuperados, siendo los principales Lys y Leu (Valdez-Hurtado *et al.*, 2018). Por lo tanto, el AC tiene potencial para ser usado como suplemento de AAs esenciales para dietas formuladas con bajas concentraciones de harina de pescado y altas concentraciones de proteína vegetal proveniente principalmente de productos derivados de la soya (p. ej. harina y concentrados) y trigo (p.ej. trigo), los cuales se caracterizan por ser pobres en AAs azufrados tales como Tau y Met. En este sentido, en uno de los primeros trabajos donde se evaluó la inclusión de un efluente como ingrediente para la elaboración de alimentos acuícolas, Kousoulaki *et al.* (2009) reportaron que la inclusión de un concentrado de agua de cola de arenque en dietas pobres en harina de pescado (50 g/kg dieta) y ricas en proteína vegetal (630 g/kg dieta), tuvo un efecto promotor de crecimiento en juveniles de salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Estos autores especulan que algunos componentes menores hidrosolubles presentes en el AC, principalmente la Tau y la hidroxiprolina fueron los responsables de estimular el crecimiento del salmón del Atlántico.

Otra estrategia propuesta para el uso de las proteínas presentes en los efluentes pesqueros es su hidrólisis para la obtención de fracciones polipeptídicas y AAs libres, y su posterior uso en la formulación de alimentos acuícolas. Para este efecto se han usado proteasas comerciales de origen vegetal tales como papaína y bromelina (Wu *et al.*, 2018), así como también alcalasa (Martínez-Montaña *et al.*, 2021b). Esto es interesante desde el punto de vista nutracéutico, pues se sabe que un proceso de hidrólisis mejora la calidad proteica (por ejemplo, mayor biodisponibilidad y bioaccesibilidad proteica) de distintos

ingredientes alimenticios. Por ejemplo, se ha reportado que la hidrólisis de AC genera péptidos de bajo peso molecular y AAs libres, los cuales al ser incluidos en un alimento rico en proteína vegetal para bagre amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*) regularon positivamente la de expresión de genes relacionados con transportadores intestinales de péptidos (PepT1), lo que mejoró la absorción intestinal de di- y tripéptidos provenientes de la digestión de proteínas alimenticias, lo que a su vez trae como consecuencia una mejora en el desempeño en crecimiento de los organismos (Wu *et al.*, 2018); sin embargo, altas concentraciones de péptidos < 500 Da en la dieta provocan una baja digestión y absorción de la proteína dietaria.

Otra de las bondades que tiene el uso de efluentes de la industria procesadora y sus derivados, son las potenciales propiedades bioactivas que poseen. Los efluentes tales como el agua de cocción y agua de cola contienen concentraciones importantes de péptidos (originados por proteólisis endógena y por degradación térmica) y otros compuestos de origen no proteínicos tales como carotenoides (principalmente en aguas de cocción de crustáceos), compuestos fenólicos, azúcares reductores y citratos (Pérez-Santín *et al.*, 2013). Estos compuestos generan propiedades antioxidantes en las fuentes que los poseen. Sin embargo, son pocos los trabajos que han evaluado el efecto bioactivo de proteínas y sus derivados provenientes de efluentes tales como el AC y agua de cocción, al ser incluidos en alimentos formulados para animales. Por otro lado, al poseer propiedades antioxidantes, los hidrolizados de proteína pueden ser adicionados a sistemas alimentarios susceptibles de rancidez oxidativa, con el fin de incrementar la estabilidad de alimentos ricos en ácidos grasos insaturados, además, los concentrados e hidrolizados de proteínas, pueden ser utilizados como ingredientes en la industria alimentaria por sus propiedades emulsificantes y espumantes (Mahdabi y Shekarabi, 2018).

En la siguiente Tabla 2, se mencionan recientes investigaciones que evaluaron la inclusión de efluentes pesqueros o sus hidrolizados proteicos en alimentos formulados para peces de importancia comercial, y su efecto en el desempeño en crecimiento, aprovechamiento alimenticio y distintos indicadores del estado de salud para algunas especies de peces de importancia comercial.

Tabla 2. Inclusión de efluentes pesqueros o sus hidrolizados proteicos y su efecto en el desempeño en crecimiento, aprovechamiento alimenticio e indicadores de salud reportados en peces de importancia comercial.

Efluente	Nivel de inclusión en el alimento acuícola	Organismo experimental	Respuesta obtenida	Referencia
Agua de cola de carcasa de atún, anchoveta y otros peces del mar de China Oriental y su hidrolizado proteico (Zhejiang Fengyu Marine Organism Products Company Limited)	Inclusiones dietarias de AC (83-249 g/kg), hidrolizados de AC (HAC; 78-233 g/kg) y harina de hidrolizado de AC (63-187 g/kg). Nivel de reemplazo óptimo: 80-90 g de HAC /kg dieta.	Bagre amarillo (<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>) (peso corporal inicial 15.67±0.31 g)	Peces alimentados con dietas conteniendo HAC sin harina de pescado tuvieron un desempeño en crecimiento similar al de aquellos alimentados con dieta control. Peces alimentados con AC o con HAC en niveles mayores a 130g/kg en la dieta, tuvieron pobre crecimiento. Altas concentraciones de péptidos <500 Da afectan negativamente la digestión y absorción proteica de los peces.	Wu <i>et al.</i> , 2018
Agua de cola condensada de macarelas (<i>Decapterus macarellus</i> , <i>Rastrelliger brachysoma</i> , <i>Rastrelliger faughni</i> , <i>Rastrelliger kanagurta</i> y <i>Scomber australasicus</i>)	Reemplazo del 0 al 50% de la proteína de pescado por el AC en el alimento. Nivel de reemplazo óptimo: 20%.	Tilapia del Nilo (<i>O. niloticus</i>) sexualmente revertida (peso corporal inicial 18.49±0.31 g; pesos corporales finales: 207-235 g)	Tras 8 meses, no hubo diferencias en supervivencia, desempeño de crecimiento, utilización alimenticia y parámetros sanguíneos de los peces alimentados con dietas con AC con respecto al control (0% AC en el alimento); sin embargo, células acumulando lípidos y actividad de lipasas intestinales se incrementan con un aumento del AC en el alimento.	Wattanukul <i>et al.</i> , (2019)
Hidrolizado de agua de cola (HAC) (Zhejiang Fengyu Marine Organism Products Company Limited)	Reemplazo del 0 al 15% de la harina de pescado por el HAC en el alimento. Nivel de reemplazo óptimo: 10%.	Alevines de anguila de campos de arroz (<i>Monopterus albus</i>) (peso corporal inicial 25 g; pesos corporales finales: 50-56 g)	Tras 56 días, los peces alimentados con dietas conteniendo HAC mostraron un mejor desempeño del crecimiento, una mejor capacidad digestiva intestinal, un mejor metabolismo de lípidos en el hígado y una mejora de la estructura del epitelio intestinal. La inclusión de HAC no afectó su capacidad antioxidante.	Shi <i>et al.</i> , (2019)

Agua de cocción de atún (ACA) (No se indica la especie)	Dieta conteniendo un 7% y 11% de proteína y aceite de ACA.	Juveniles de perca regia (<i>Argyrosomus regius</i>) (peso corporal inicial 12.51 g; peso corporal final: 80.17±17.17g)	Tras 60 días, el crecimiento y conversión alimenticia fue menor en peces alimentados con dietas con ACA. El músculo de los peces alimentados con dietas conteniendo ACA contenían niveles de proteína, DHA y n-3 PUFA con respecto al control.	Estévez <i>et al.</i> , (2022)
---	--	---	--	--------------------------------

5. Conclusiones

Los efluentes pesqueros como el agua de cola y cocción se han asociado con efectos negativos al ambiente (si son descargados sin tratamiento), al poseer una gran cantidad de proteínas, pueden ser aprovechados en la obtención y generación de productos de alto valor como son los concentrados proteicos, hidrolizados proteicos (HP) y fracciones peptídicas. Los HP de agua de cola son reconocidos como fuentes de péptidos con propiedades bioactivas, AAs esenciales en proporciones considerables y no esenciales de importancia comercial, en particular la taurina. Por su parte, las aguas de cocción contienen péptidos y AAs hidrofóbicos que le confiere distintas propiedades bioactivas, entre las cuales destaca la actividad antioxidante. Por lo que el uso de efluentes como potenciales fuentes de ingredientes para la formulación de alimentos acuícolas funcionales, es prometedor, pero aun pobremente estudiado. La revalorización de los efluentes pesqueros podría coadyuvar a reducir los daños ambientales y abrir un campo de aprovechamiento en la industria. Finalmente, se recomienda realizar investigación cuyo objetivo sea evaluar los mecanismos a través de los cuales moléculas de origen proteico que muestren potencial bioactivo (p. ej. antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio) y que sean derivadas de efluentes pesqueros, puedan ayudar en la mejora de la salud y desempeño productivo de organismos acuáticos de importancia comercial.

6. Agradecimientos

Los autores agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado al proyecto de Ciencia Básica (clave 258128): “Caracterización de las propiedades fisicoquímicas y bioactivas de hidrolizados proteicos obtenidos del agua de cola generada por la industria pesquera reductora”.

7. Referencias

- Amado, I. R., González, M. P., Murado, M. A., & Vázquez, J. A. (2016). Shrimp wastewater as a source of astaxanthin and bioactive peptides. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(3), 793-805.
- Amado, I. R., Vázquez, J. A., González, P., Esteban-Fernández, D., Carrera, M., & Piñeiro, C. (2014). Identification of the major ACE-inhibitory peptides produced by enzymatic hydrolysis of a protein concentrate from cuttlefish wastewater. *Marine Drugs*, 12(3), 1390-1405.
- Amado, I. R., Vázquez, J. A., González, M. P., & Murado, M. A. (2013). Production of antihypertensive and antioxidant activities by enzymatic hydrolysis of protein concentrates recovered by ultrafiltration from cuttlefish processing wastewaters. *Biochemical Engineering Journal*, 76, 43-54.
- Aanand, S., Divya, M., Deepak, T., Padmavathi, P., & Manimekalai, D. (2017). Review on seafood processing plant wastewater bioremediation—A potential tool for waste management. *International Journal of Applied Research*, 3(7), 01-04.
- Bello-Bugallo, P. M., Stupak, A., Andrade, L. C., & López, R. T. (2012). Material Flow Analysis in a cooked mussel processing industry. *Journal of Food Engineering*, 113(1), 100-117.
- Bethi, C. M., Narayan, B., Martin, A., & Kudre, T. G. (2020). Recovery, physicochemical and functional characteristics of proteins from different meat processing wastewater streams. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(20), 25119-25131.
- Bruno, S. F., Ekorong, F. J. A. A., Karkal, S. S., Cathrine, M. S. B., & Kudre, T. G. (2019). Green and innovative techniques for recovery of valuable compounds from seafood by-products and discards: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 85, 10-22.
- Calabrò, V., & Basile, A. (2011). Fundamental membrane processes, science and engineering *Advanced Membrane Science and Technology for Sustainable Energy and Environmental Applications* (pp. 3-21): Elsevier.
- Estévez, A., Blanco, B., Fernández, L., Ferreira, M., & Soula, M. (2022). Effects of alternative and sustainable ingredients, insect meal, microalgae and protein and lipid from tuna cooking water, on meagre (*Argyrosomus regius*) growth, food conversion and muscle and liver composition. *Aquaculture*, 548, 737549.
- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma.
- Fahim, F. A., Fleita, D. H., Ibrahim, A. M., & El-Dars, F. M. (2001). Evaluation of some methods for fish canning wastewater treatment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 127(1), 205-226.
- Forghani, B., Bordes, R., Ström, A., & Undeland, I. (2020). Recovery of a protein-rich biomass from shrimp (*Pandalus borealis*) boiling water: a colloidal study. *Food chemistry*, 302, 125299.
- Girgih, A. T., He, R., Hasan, F. M., Udenigwe, C. C., Gill, T. A., & Aluko, R. E. (2015). Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food Chemistry*, 173, 652-659.
- Gómez, M. T., Iglesias, A. M., López, R. T., & Bugallo, P. B. (2016). Towards sustainable systems configurations: application to an existing fish and seafood canning industry. *Journal of Cleaner Production*, 129, 374-383.

- Greyling, N., Bordoloi, A., & Goosen, N. J. (2020). Optimising enzymatic conditions of monkfish (*Lophius vomerinus*) heads hydrolysis towards potential waste biomass valorisation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00650-z>
- Hung, C. C., Yang, Y. H., Kuo, P. F., & Hsu, K. C. (2014). Protein hydrolysates from tuna cooking juice inhibit cell growth and induce apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7. *Journal of Functional Foods*, 11, 563-570.
- Jao, C.-L., & Ko, W.-C. (2002). 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. *Fisheries Science*, 68(2), 430-435.
- Kasiwut, J., Youravong, W., & Sirinupong, N. (2019). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced from tuna cooking juice hydrolysate by continuous enzymatic membrane reactor. *Journal of Food Biochemistry*, 43(12), e13058.
- Kousoulaki, K., Albrektsen, S., Langmyhr, E., Olsen, H.J., Campbell, P. & Aksnes, A. (2009). The water soluble fraction in fish meal (stickwater) stimulates growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) given high plant protein diets. *Aquaculture*, 289, 74-83.
- Kumar, P., Sharma, N., Ranjan, R., Kumar, S., Bhat, Z., & Jeong, D. K. (2013). Perspective of membrane technology in dairy industry: A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(9), 1347.
- Lee, J. K., Li-Chan, E. C., Jeon, J.-K., & Byun, H.-G. (Eds.). (2014). *Development of functional materials from seafood by-products by membrane separation technology*: Springer.
- Lee, G. W., Yoon, I. S., Kang, S. I., Lee, S. G., Kim, J. I., Kim, J. S., & Heu, M. S. (2017). Functionality and biological activity of isolate processed water generated during protein isolate preparation of fish roes using an isoelectric solubilization and precipitation process. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(6), 694-706.
- Mahdabi, M., & Hosseini Shekarabi, S. P. (2018). A comparative study on some functional and antioxidant properties of kilka meat, fishmeal, and stickwater protein hydrolysates. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 27(7), 844-858.
- Marti-Quijal, F. J., Remize, F., Meca, G., Ferrer, E., Ruiz, M. J., & Barba, F. J. (2020). Fermentation in fish and by-products processing: An overview of current research and future prospects. *Current Opinion in Food Science*, 31, 9-16.
- Martínez-Montaño, E., Osuna-Ruíz, I., Benítez-García, I., Osuna, C. O., Pacheco-Aguilar, R., Navarro-Peraza, R. S., ... & Salazar-Leyva, J. A. (2021a). Biochemical and antioxidant properties of recovered solids with pH shift from fishery effluents (sardine stickwater and tuna cooking water). *Waste and Biomass Valorization*, 12(4), 1901-1913.
- Martínez-Montaño, E., Sarmiento-Machado, R. M., Benítez-García, I., Pacheco-Aguilar, R., Navarro-Peraza, R. S., Sánchez, M. E. L., ... & Leyva, J. A. S. (2021b). Effect of degree of hydrolysis on biochemical properties and biological activities (antioxidant and antihypertensive) of protein hydrolysates from Pacific thread herring (*Ophistonema libertate*) stickwater. *Waste and Biomass Valorization*, <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01590-z>

- Matak, K. E., Tahergorabi, R., & Jaczynski, J. (2015). A review: Protein isolates recovered by isoelectric solubilization/precipitation processing from muscle food by-products as a component of nutraceutical foods. *Food Research International*, 77, 697-703.
- Medina Uzcátegui, L. U., Vergara, K., & Martínez Bordes, G. (2021). Sustainable alternatives for by-products derived from industrial mussel processing: A critical review. *Waste Management & Research*, 0734242X21996808. <https://doi.org/10.1177/0734242X21996808>
- Mhina, C. F., Jung, H. Y., & Kim, J. K. (2020). Recovery of antioxidant and antimicrobial peptides through the reutilization of Nile perch wastewater by biodegradation using two *Bacillus* species. *Chemosphere*, 253, 126728.
- Navarro-Peraza, R. S., Osuna-Ruiz, I., Lugo-Sánchez, M. E., Pacheco-Aguilar, R., Ramírez-Suárez, J. C., Burgos-Hernández, A., ... & Salazar-Leyva, J. A. (2020). Structural and biological properties of protein hydrolysates from seafood by-products: a review focused on fishery effluents. *Food Science and Technology*, 40, 1-5.
- Pacheco-Aguilar, R., De la Barca, A. M., Castillo-Yañez, F. J., Marqués-Ríos, E., García-Carreño, F. L., & Valdez-Hurtado, S. (2018). Comparación del efecto de dos tratamientos enzimáticos con actividad colagenasa y una centrifugación complementaria en las características fisicoquímicas del agua de cola generada por la industria sardinera. *Biotecnia*, 20(3), 58-64.
- Pasupuleti, V. K., & Braun, S. (Eds.). (2008). *State of the art manufacturing of protein hydrolysates*: Springer.
- Pérez-Santín, E., Calvo, M. M., López-Caballero, M. E., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Compositional properties and bioactive potential of waste material from shrimp cooking juice. *LWT-Food Science and Technology*, 54(1), 87-94.
- Prieto, M. A., Prieto, I., Vázquez, J. A., & Ferreira, I. C. (2015). An environmental management industrial solution for the treatment and reuse of mussel wastewaters. *Science of the Total Environment*, 538, 117-128.
- Salze, G.P. & Davis, D.A. (2015). Taurine: a critical nutrient for future fish feeds. *Aquaculture*, 437, 215-229.
- Shi, Y., Zhong, L., Ma, X., Liu, Y., Tang, T., & Hu, Y. (2019). Effect of replacing fishmeal with stickwater hydrolysate on the growth, serum biochemical indexes, immune indexes, intestinal histology and microbiota of rice field eel (*Monopterus albus*). *Aquaculture Reports*, 15, 100223.
- Tang, W., Zhang, H., Wang, L., Qian, H., & Qi, X. (2015). Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. *Food Chemistry*, 168, 115-123.
- Taskaya, L., & Jaczynski, J. (2009). Flocculation-enhanced protein recovery from fish processing by-products by isoelectric solubilization/precipitation. *LWT-Food Science and Technology*, 42(2), 570-575.
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.
- Tremblay, A., Corcuff, R., Goulet, C., Godefroy, S. B., Doyen, A., & Beaulieu, L. (2020). Valorization of snow crab (*Chionoecetes opilio*) cooking effluents for food applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(1), 384-393.
- Valdez-Hurtado, S., Goycolea-Valencia, F., & Márquez-Ríos, E. (2018). Efecto de una centrifugación complementaria en la composición química y reológica del agua de cola. *Biotecnia*, 20(2), 95-103.

- Vázquez-Sánchez, D., Leite, S. B., Galvão, J. A., & Oetterer, M. (2021). Composition, functional properties, antioxidant activity and efficiency as bacterial growth medium of minced tilapia (*Oreochromis niloticus*) wash-water. *Waste and Biomass Valorization*, 12, 4375–4386. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01324-7>
- Venugopal, V., & Sasidharan, A. (2021). Seafood industry effluents: environmental hazards, treatment and resource recovery. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2), 104758.
- Venugopal, V. (2021). Valorization of seafood processing discards: bioconversion and bio-refinery approaches. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 132.
- Wattanagul, U., Wattanakul, W., & Thongprajukaew, K. (2019). Optimal replacement of fish meal protein by stick water in diet of sex-reversed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animals*, 9(8), 521.
- Wu, D., Zhou, L., Gao, M., Wang, M., Wang, B., He, J., ... & Pu, Q. (2018). Effects of stickwater hydrolysates on growth performance for yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture*, 488, 161-173.
- Ye, A. (2008). Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications—a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(3), 406-415.
- Yoon, I. S., Lee, G. W., Kang, S. I., Park, S. Y., Kim, J. S., & Heu, M. S. (2017). Food functionality and biological activity of processed waters produced during the preparation of fish roe concentrates by cook-dried process. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(5), 506-519.

Bacteriófagos: Herramientas de Control Biológico para una Acuicultura Sostenible

Eduardo Quiroz-Guzmán^{1*}, Carlos Omar Lomelí-Ortega², Juan Manuel Martínez-Villalobos³

¹CONACYT-CIBNOR Av. Instituto Politécnico Nacional 195. Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, 23096. La Paz, Baja California Sur, México

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Av. Instituto Politécnico Nacional 195. Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, 23096. La Paz, Baja California Sur, México.

³Universidad Autónoma de Nuevo León Apartado postal 5 «F», 66451, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México

*Autor de correspondencia: E. Quiroz-Guzmán. Tel: +52 612 1238484 ext. 3664; fax: +52 612 122 53 22, e-mail: equiroz@cibnor.mx

Resumen

La terapia con fagos, trata infecciones bacterianas con bacteriófagos solos o en combinación con antibióticos tradicionales, se ha demostrado en casos de emergencia en diversos países; sin embargo, para que un bacteriófago sea útil para la terapia, debe aislarse del medio ambiente y demostrar que tiene ciertas características más allá de simplemente lisar cepas patógenas (bacteriana diana). Esto incluye características deseables tales como un rango de hospedadores relativamente amplio y la capacidad de formar un lisógeno. Algunas de estas variaciones son utilizadas regularmente por algunos grupos de investigación. En esta revisión, describimos (1) los procedimientos de aislamiento y las variaciones que están diseñadas para aislar fagos con rangos de hospedadores más amplios, (2) los procedimientos de caracterización utilizados para mostrar que un fago puede tener utilidad en la terapia con fagos, incluidos algunos de los límites de dicha caracterización y (3) las advertencias de análisis esenciales para obtener genomas de alta calidad, excluyendo candidatos no deseados, evaluando rigurosamente la seguridad de un genoma de fagos y evaluando la contaminación de secuenciación. Este flujo de trabajo se ha desarrollado de acuerdo con los estándares de la comunidad para la secuenciación de alto rendimiento de genomas virales, así como los principios para los fagos ideales utilizados para la terapia. Proponemos estas pautas como un estándar mínimo como nuevos candidatos a fármacos en investigación.

Palabras clave: *Bacteriófagos, Acuicultura, Fagoterapia, lítico, lisógenos*

1. Introducción

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) informó que la obtención de alimentos suficientes y nutritivos se ve comprometida por el rápido aumento de la población humana (FAO, 2019a). Como resultado, la acuicultura, ha sido una actividad crucial que ha contribuido a los alimentos de origen acuático para la seguridad alimentaria nacional y el desarrollo económico.

Actualmente, especies acuáticas valiosas, como camarones, peces marinos y de agua dulce, se consideran productos básicos para el mercado de exportación y ganancias monetarias. La producción total de camarón de cultivo mundial alcanzó casi 4 millones de toneladas en 2018, aumentando entre un 3 y un 5% con respecto a 2017 (FAO, 2019a).

También se estimó que la producción mundial de pescado aumentaría un 2,1% a 178,8 millones de toneladas en 2018, con 87 millones de toneladas (48,7%) derivadas de la acuicultura y 91.8 millones de toneladas (51,3%) de la pesca de captura (FAO, 2019a). Este cambio sustancial en el sector de la acuicultura resultó en que se superara la cantidad de pesca de captura silvestre para consumo humano. Además, los comportamientos de los consumidores se han vuelto cada vez más universales, especialmente en los países desarrollados. Por ejemplo, el consumo de camarón per cápita ha superado el máximo de 4.5 libras en 2018 (FAO, 2019a). China continental produjo 66,8 millones de toneladas de pescado para consumo humano en 2016, 49,2 millones de toneladas (74%) de la acuicultura y 17,6 millones de toneladas (26%) de la captura silvestre (FAO, 2019b).

Sin embargo, en la última década ha habido un incremento de enfermedades en poblaciones cultivadas y naturales, incluyendo peces, algas marinas e invertebrados (Egan & Gardiner, 2016). En las últimas décadas, los antibióticos fueron usados en los sistemas acuícolas como medida correctiva e inclusive preventiva; pero el uso indiscriminado de los mismos se consideró un riesgo para la salud humana por el potencial surgimiento y dispersión de bacterias patógenas resistentes y multi resistentes a antibióticos (Wittebole *et al.*, 2014; Gon Choudhury *et al.*, 2017). En consecuencia, la mayoría de los antibióticos fueron prohibidos en acuicultura, generando un vacío terapéutico que puso en riesgo la producción y el desarrollo del sector.

Para el combate a las infecciones por bacterias patógenas oportunistas en acuicultura se han empleado diferentes estrategias consideradas más seguras y amigables con el ecosistema, desafortunadamente su eficacia parece depender de lograr un balance químico, físico y biológico en los sistemas de producción, los cuales se encuentran en cambios constantes. En particular el

establecimiento de una microbiota saludable parece ser una estrategia ambientalmente segura, sin embargo, la aplicación directa de prebióticos, microorganismos benéficos (como los denominados probióticos), postbióticos, y para probióticos no ha logrado un control biológico con éxito. Otra alternativa que se está explorando actualmente es el uso de bacteriófagos, o simplemente fagos, los cuales no presentan un metabolismo intrínseco y funcionan solo como parásitos que llevan en su material genético la información necesaria para tomar la maquinaria celular de su hospedero y producir nuevos fagos que propaguen sus genes (Kutter & Sulakvelidze, 2004; Hanlon, 2007; Forterre & Prangishvili, 2009). Los fagos son considerados parásitos que solo se benefician con la infección y disminuyen la salud del hospedero. Sin embargo, los fagos pueden ser comensales (cuando el fago se beneficia sin afectar la salud del hospedero) o mutualistas (donde ambos se benefician), y a través de estos mecanismos proveer ventajas que promuevan la evolución y biodiversidad (Roossinck, 2015), en los ecosistemas, siendo las dos más importantes su influencia en la evolución de los genomas bacterianos a través de la lisogenia y su impacto en la modulación del flujo de materia y energía a nivel global (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004).

1.2 Manipulación de la microbiota

De manera cotidiana se ha buscado la eliminación de patógenos específicos para corregir infecciones, así como evitar la proliferación de los mismos para prevenirlas (Lomeli-Ortega 2018). En la tabla 1 se resumen los principales métodos para el control de patógenos basados en la manipulación de la microbiota. En el caso de los prebióticos para uso humano, su mecanismo se basa en el aporte de polisacáridos no digeribles en la dieta, los cuales favorecerán el crecimiento de bacterias comensales en el tracto (Roberfroid *et al.*, 2010). Sin embargo, su mayor limitación es la inhabilidad de predecir o cambiar la especificidad de la manipulación, aunado a las condiciones específicas de cada individuo. Los antibióticos por su parte, son agentes xenobióticos de amplio espectro que modulan el crecimiento microbiano a través de la inhibición de la maquinaria celular esencial. Sin embargo, debido al amplio espectro de acción causan cambios no deseables en la comunidad y la selección de cepas resistentes, las cuales actualmente son un problema de salud pública a nivel mundial. Uno de los mecanismos celulares usados para la manipulación de la microbiota es el trasplante de microbiota, el cual se basa en el reemplazo de la comunidad microbiana más resistente a infecciones que proviene de un donador sano (Borody & Khurts, 2012). A pesar de los efectos benéficos que se puedan tener, el mecanismo de acción no es claro y una

mejor aproximación sería la transferencia de una comunidad sintética la cual pueda replicar los procesos de un consorcio complejo, pero que contenga miembros definidos previamente caracterizados (Faith *et al.*, 2010).

Por otra parte, en el caso de los bacteriófagos el estado lisogénico es altamente evolucionado, requiriendo la co-evolución del fago y su hospedero que presumiblemente refleja varias ventajas para ambos. En la lisogenia el fago aporta genes de conversión que no solo modifican el fenotipo y genotipo de las cepas, sino que proveen ventajas adaptativas que contribuyen a la sucesión de las especies bacterianas (Lenski & Levin, 1985). Por su parte, el uso de fagos líticos tiene mayor aceptación, ya que estos fagos usan a su hospedero como una maquinaria de producción de nuevas partículas virales y al final del ciclo de replicación el hospedero muere (Breitbart 2012; Drulis-Kawa *et al.*, 2012). Subsecuentemente, en el ambiente, los nuevos fagos líticos pueden infectar y lisar a las bacterias vecinas (Doss *et al.*, 2017). Con la lisis no solo se da la remoción de un hospedero específico de la comunidad, también se crean nuevos nichos que especies menos competentes pueden ocupar y se estimula el crecimiento de ciertos miembros al liberarse sustratos orgánicos a partir de las células lisadas (Middleboe & Lyck, 2002). Dentro de las principales ventajas del uso de fagos como agentes antimicrobianos se encuentran la: I) actividad contra todo tipo de bacterias incluyendo multirresistentes a antibióticos; II) un espectro de acción focalizado en patógenos específicos, lo cual permite preservar el microbioma existente; III) bajo nivel de riesgo por efectos secundarios; IV) amplia distribución dentro el organismo tratado; V) presentan un bajo costo-beneficio y finalmente VI) mayor eficacia en comparación con los antibióticos, VII) los fagos se replican en el sitio donde se encuentra su hospedero, haciendo más eficiente el tratamiento y VIII) se auto-limitan al no estar presente su hospedero, y IX) a pesar de presentarse resistencia a los fagos esta se puede evitar con el uso de cocteles de fagos (Wittebole *et al.*, 2014; Pal, 2015).

Tabla 1 Métodos químicos, celulares y basados en bacteriófagos usados comúnmente en la manipulación de las comunidades microbianas. Tomado de Sheth *et al.*, (2016); Lomeli Ortega (2018).

Método (Base)	Formulación común	Mecanismo de acción
Prebióticos (Químico)	Fibras dietéticas, oligosacáridos	Promueve el crecimiento bacteriano, mecanismo generalmente desconocido
Antibióticos (Químico)	β -lactamas, aminoglicosidasas, glicopéptidos, quinolonas, metronodazole	Bloqueo de la síntesis de pared celular, proteínas, peptidoglicano y síntesis y replicación del material genético
Trasplante de microbiota (Celular)	Trasplante de microbiota fecal	Reemplazo de la comunidad nativa, mecanismo generalmente desconocido Competencia por nutrientes o nichos,
Probióticos (Celular)	Lactobacillus, Bifidobacteria, proteobacterias	producción de antimicrobianos, disrupción del quorum sensing, estimulación del sistema inmune
Bacteriófagos (Fagos)	Cepas específicas de fagos o cocteles de fagos	Lisis celular (lítico), integración genómica (lisogénico)

1.3 Bacteriófagos

Los bacteriófagos (fagos) son las entidades biológicas más abundantes en el medio marino y desempeñan papeles importantes, por ejemplo, estructurar la diversidad y la evolución bacteriana mediante la selección de genotipos resistentes a fagos y como impulsores clave de la transferencia horizontal de genes (Touchon, Moura de Sousa & Rocha 2017). El fuerte potencial lítico de los fagos contra huéspedes bacterianos marinos específicos ha llevado a un creciente interés en el uso terapéutico de fagos líticos (terapia con fagos) para controlar las infecciones bacterianas patógenas en la acuicultura (Quiroz-Guzman *et al.*, 2018; Castillo *et al.*, 2019; Lomeli-Ortega *et al.*, 2020; Veyrand-Quiroz *et al.*, 2020). Se han caracterizado varios vibriofagos de sistemas marinos en términos de morfología, composición genómica y propiedades del rango de hospedadores (Kellogg *et al.*, 1995; Comeau, Chan & Suttle 2006; Tan, Gram & Middelboe 2014; Kalatzis *et al.*, 2017). En particular, se encontró que un fago, KVP40, tenía un rango de hospedadores muy amplio, infectando al menos ocho especies de *Vibrio* y una de *Photobacterium* (Matsuzaki *et al.*, 1992). El receptor de este fago se ha identificado como proteína de membrana externa K (OmpK), que generalmente está presente en el grupo *Vibrio* (Inoue, Matsuzaki & Tanaka 1995). Además, los vibriofagos se han aplicado con éxito en ensayos de terapia de fagos con resultados prometedores en la supervivencia de peces y crustáceos (Pereira *et al.*, 2011; Higuera *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Kalatzis *et al.*, 2016; Kalatzis *et al.*, 2018; Rørbo *et al.*, 2018; Quiroz-Guzmán *et al.*, 2018; Castillo *et al.*, 2019; Lomeli-Ortega *et al.*, 2020; Veyrand-Quiroz *et al.*, 2020). Donde la mayoría de los experimentos de laboratorio *in vitro* se ha observado un control con los fagos de cepas de *V. parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *V. campbellii*, *V. anguillarum*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, sin embargo, el recrecimiento de células después de la infección por fagos sugirió la aparición de clones resistentes a fagos después de la exposición a fagos (Mateus *et al.*, 2014; Tan 2014; Kalatzis *et al.*, 2016) (Figura 1). En conjunto, estos estudios enfatizaron que una caracterización detallada de las interacciones fago-huésped y las estrategias de defensa del fago en los patógenos es esencial para la aplicación exitosa del control de patógenos oportunistas basado en fagos. De hecho, Abedon *et al.*, (2011) proponen que los bacteriófagos puedan ser utilizados tanto de forma profiláctica como terapéutica, ya que tienen como objetivo mantener el balance del ambiente enfocándose solo en bacterias patógenas específicas.

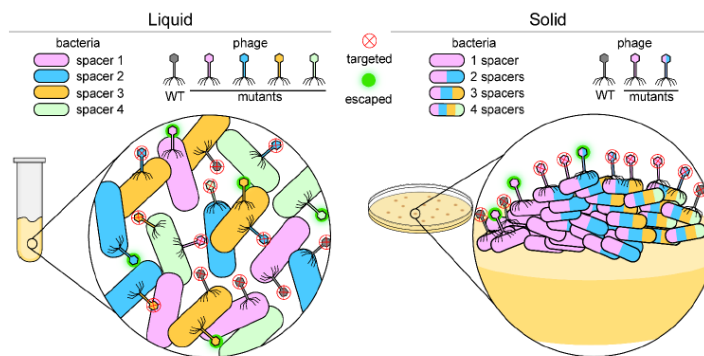


Figura 1. Bacteria versus bacteriófagos para defenderse de los fagos, las bacterias (cápsulas coloreadas) adquieren una región del genoma del fago y la insertan en su propio genoma como "espaciador". Cuando crecen en un ambiente líquido (izquierda), las células bacterianas individuales generalmente adquieren un solo espaciador que se dirige solo a una región del fago de tipo salvaje (WT) (que se muestra en gris). En la figura, cada célula bacteriana tiene uno de cuatro espaciadores diferentes (que se muestran en azul, verde, naranja y rosa). Sin embargo, los fagos mutan en un esfuerzo por eludir estas defensas: una mutación en la región del genoma del fago correspondiente a, digamos, un espaciador azul significa que el fago puede atacar y escapar de la defensa de las bacterias con espaciadores azules (círculo verde difuso), pero no bacterias con espaciadores de color verde, naranja o rosa (X roja dentro de un círculo). Cuando crece sobre una superficie sólida (derecha), si una célula individual adquiere, digamos, un espaciador rosa, pasará a formar una colonia de células resistentes a los fagos (recuadro). Si un fago gana una mutación en la región objetivo del espaciador rosa, el fago escapará a la detección. Para mantenerse protegidas, algunas células bacterianas dentro de la colonia adquieren múltiples espaciadores (células bacterianas multicolores) y pueden combatir varios fagos mutantes Tomada de Schelling y Sashital 2020.

1.4 Características deseables de los fagos para la terapia con fagos

Los fagos son altamente diversos en sus características físicas y genómicas, por lo que es importante hacer una selección previa de los mismos para llegar a una terapia exitosa. Dentro de los primeros puntos a considerar es el uso de fagos líticos y descartar el uso de fagos lisogénicos, ya que estos últimos dentro de su ciclo de replicación aportan genes de conversión que no solo modifican el fenotipo y genotipo de las cepas sino que proveen ventajas adaptativas que contribuyen a la sucesión de las especies bacterianas (Lenski & Levin, 1985), pueden permanecer en estado lisogénico por tiempo indefinido y conferir genes que aumentan la virulencia o inclusive convertir a hospederos no virulentos a virulentos (Obeng *et al.*, 2016; Doss *et al.*, 2017). El uso de fagos líticos tiene mayor aceptación ya que estos fagos usan a su hospedero como una maquinaria de producción de nuevas partículas virales y al final del ciclo de replicación el hospedero es destruido (Breitbart 2012; Drulis-Kawa *et al.*, 2012). Posteriormente, la nueva progenie liberada al ambiente es capaz de infectar células vecinas y otros hospederos susceptibles (Doss *et al.*, 2017); permitiendo no solo la remoción de un hospedero específico de la comunidad, también se crean nuevos nichos disponibles que especies menos competentes pueden ocupar y se estimula el crecimiento de ciertos miembros de la comunidad al liberarse sustratos orgánicos a partir de las células lisadas (Middleboe & Lyck, 2002).

Otra de las características que se buscan en los fagos es una amplia tolerancia a diferentes parámetros ambientales como la temperatura, salinidad, radiación UV y pH, dependiendo del sitio de aplicación. Los fagos varían ampliamente en su sensibilidad a estos agentes físicos y químicos, en maneras que son generalmente impredecibles o necesitan ser determinadas experimentalmente en cada caso (Kutter & Sulakvelidze, 2004). En el caso de radiación ultra violeta, se ha observado que los fagos son sensibles en un intervalo de 260-315 nm de UV (Figura 2a), en el caso de los fagos lisogénicos estos se ven forzados a entrar al ciclo lítico cuando la luz UV daña el ADN del hospedero (Raya & Hébert, 2009).

Con respecto a la temperatura, esta afecta a los fagos de diferentes maneras, ya que interviene en el reconocimiento, unión, penetración y multiplicación de los fagos en sus hospederos (Silva *et al.*, 2014b). Por lo general, los fagos son más estables a bajas temperaturas (Gill *et al.*, 2010), pero lo mismo no sucede a mayores temperaturas (Figura 2b). El fago P22 que infecta a *Salmonella entérica* genera su mayor producción de fagos a temperaturas entre 30 a 39 °C (Pope *et al.*, 2004). Sin embargo, esto al parecer no es aplicable a todos los fagos, ya que la teoría de que “más caliente es mejor” menciona que los genotipos de fagos con temperaturas óptimas altas tienen una mayor tasa de crecimiento máxima y tienen un mayor intervalo de temperatura (Knies *et al.*, 2009).

La salinidad y el pH juegan un papel muy importante en la estabilidad y actividad de la partícula viral y en la conformación de los receptores en las células bacterianas (Wichels *et al.*, 1998; Binetti *et al.*, 2002; Seaman & Day, 2007). A salinidades bajas se da una interacción de los iones con las proteínas y se estabiliza la estructura de las proteínas a través de la neutralización de las cargas; sin embargo, a salinidades altas se genera una desnaturalización y se puede también afectar la estabilidad del ácido nucleico del fago (Fennema, 1996; Silva *et al.*, 2014b) (Figura 2c). Por su parte, el pH está relacionado con el anclaje, infectividad, replicación intracelular y multiplicación de los fagos (Leverentz *et al.*, 2001; 2004), donde valores entre 6 y 9 generalmente son óptimos para los fagos y otros valores generan una disminución de la actividad (Pirisi, 2000; Jepson & March, 2004; Silva *et al.*, 2014b). Una manera de evitar los problemas asociados a la susceptibilidad de los fagos a las condiciones ambientales es realizar el aislamiento de los fagos a partir de las mismas zonas o sitios donde se busca aplicar la fagoterapia. Con lo anterior, los fagos aislados ya habrán pasado por un proceso previo de selección y se espera que tengan una mayor tolerancia a las condiciones ambientales que se puedan presentar en dicho lugar, pero es importante aun así realizar la caracterización para conocer los límites de cada fago a las principales condiciones ambientales y

con ello tener una base de datos amplia que permita una mejor selección de los fagos a implementar durante una terapia.

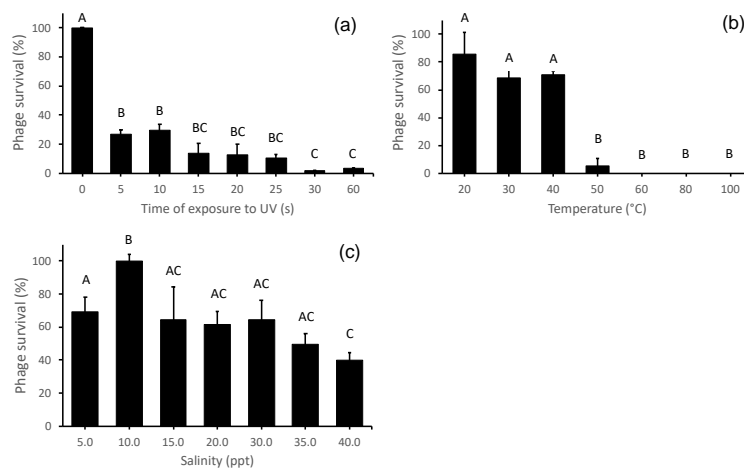


Figura 2. Análisis de estabilidad del bacteriófago vB_Vc_SrVc9, (a) Influencias de UV después de la incubación en diferentes momentos, (b) Influencias de diferentes temperaturas después de una hora de incubación, (c) Influencias de diferentes salinidades de TSB + durante una hora de incubación. Los datos fueron los títulos de fagos y se determinaron utilizando el método de agar de doble capa. Los datos son la media y la desviación estándar de tres ensayos independientes. Las diferencias estadísticas ($p < .05$) se indican con diferentes letras mayúsculas. Tomado de Lomelí-Ortega *et al.*, (2020)

1.5 Rango de hospedero y eficiencia de plaqueo

Una de las primeras pruebas *in vitro* que se realizan para conocer el potencial de los fagos es el rango de hospedero, el cual utiliza la prueba de gota como base para conocer si un fago es capaz de generar una zona de lisis sobre el crecimiento de una cepa bacteriana. Cada cepa bacteriana que fue lisada se considera cepa susceptible y se saca un porcentaje basado en el número de cepas lisadas sobre el total de cepas evaluadas (Mirzaei *et al.*, 2015). Con esta información somos capaces de evaluar la capacidad de reconocimiento y lisis del fago con respecto a un grupo de potenciales hospederos. A pesar de que podemos aislar fagos de una misma fuente es posible que estos presenten una gran diferencia en sus perfiles de lisis, desde un valor estrecho cuando solo es capaz de reconocer pocas o inclusive a una sola cepa bacteriana hasta un valor amplio donde no solo se reconocen varias cepas sino inclusive cepas de diferentes especies relacionadas (Salazar-Llanos, 2008). Esta variación se debe a que los fagos reconocen a las bacterias a través de los receptores de la superficie de la membrana (Gram negativa) o pared celular (Gram positiva) y no todos los fagos cuentan todos los receptores por lo que una cepa de bacteria puede ser infectada por diferentes fagos usando receptores específicos o varias cepas de bacterias pueden ser infectadas por un mismo fago

a través de un receptor conservado (Comeau *et al.*, 2006; Labrie *et al.*, 2010). Considerando este punto, muchas veces durante la evaluación del rango de hospederos podemos tener falsos negativos, ya que los fagos pueden ser capaces de infectar al hospedero, pero no generan una zona de lisis definida debido a una baja susceptibilidad de la cepa bacteriana relacionada a la cantidad de sitios de reconocimiento que el fago puede utilizar (Rakhuba *et al.*, 2010). Stalin & Srinivasan (2016) reportaron que un fago específico para *V. parahaemolyticus* aparentemente no era capaz de lisar cepas de otras cepas de *V. alginolyticus* a través de prueba de puntos, pero si fueron capaces de observar lisis a través de la eficiencia de plaqueo. La eficiencia de plaqueo consiste en realizar la medición de la progenie de una muestra de fagos usando un nuevo hospedero y comparando ese valor con respecto al obtenido con la cepa hospedera original (Hyman & Abedon, 2010). Aunque la cantidad de progenie cuantificada pueda ser muy baja, podemos conocer si realmente el fago es capaz de lisar nuevos hospederos con una mayor precisión. Para estandarizar los valores de la eficiencia de plaqueo, Khan-Mirzaei & Nilsson (2015) proponen una serie de intervalos para su clasificación. Los autores manejan como alta producción a los valores superiores a 0.5, producción media cuando el valor es mayor a 0.1 y menor a 0.5, producción baja cuando el valor es mayor a 0.001 y menor a 0.1; y por último una producción ineficiente cuando el valor es menor a 0.001 (Tabla 2). Usando este sistema de clasificación, Kalatzis *et al.*, (2016) encuentran que dos de sus fagos son capaces de usar como hospederos a varias cepas de *V. alginolyticus* con una producción que varía entre alta, baja o ineficiente, pero solo son capaces de lisar a una cepa de *V. harveyi* y una de *V. parahaemolyticus* con una producción alta y baja respectivamente. Aunque los autores mencionan que esta capacidad de usar especies del clado Harveyi necesita ser explorada, la naturaleza conservativa en las estructuras de los receptores de fagos de lipopolisacáridos (LPS) en la membrana externa puede ser la explicación de esta capacidad para infectar diferentes especies de *Vibrio* (Rakhuba *et al.*, 2010). Por lo anterior, el uso de un método basado en la eficiencia de plaqueo puede ser una mejor opción para conocer el potencial de los fagos y poder seleccionar con mayor precisión a los fagos para su uso terapéutico o biotecnológico.

Tabla 2. Rango de hospedadores del bacteriofago vB_Pd_PDCC-1 contra *Photobacterium damsela* y *Vibrio*: *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii* y *V. alginolyticus*. La EOP se expresa como: la fracción de la infectividad de los fagos frente a las cepas probadas a la infectividad de los fagos frente a la cepa huésped. Alta (EOP \geq 0,5), Moderada (EOP \geq 0,1- <0,5) y Baja (EOP \leq 0,1). Tomada de Veyrand-Quirós *et al.*, (2020)

Cepa	Nombre	Titulación (UFP/mL)	EOP		
			Alta	Moderada	Baja
CAIM 1910	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	2.17E+08	1	ND	ND
CIBGEN- 001	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.38E+09	6.38	ND	ND
CIBGEN- 002	<i>Vibrio campbellii</i>	8.00E+08	3.69	ND	ND
CIBGEN- 003	<i>Vibrio campbellii</i>	7.42 \pm 09	5.79	ND	ND
CIBGEN- 004	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1.18E+09	5.46	ND	ND

*ND, no detectado

1.6 Otras propiedades

A pesar de que la aparición de cepas resistentes a fagos es una característica no deseada y difícil de evitar, se puede tener cierta ventaja ya que la presión selectiva por fagos desencadena una serie de cambios en el hospedero que pueden reducir su peligrosidad. Uno de estos cambios es el relacionado a la pérdida o cambio en los receptores de la superficie que evitan que el reconocimiento por parte del fago. Para identificar esta resistencia se han realizado cinéticas de absorción de fagos en cepas resistentes y se ha hecho proteómica comparativa de las cepas susceptibles y resistentes para evaluar el costo metabólico (Stoddard *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2010). En la cinética de absorción fagos en cepas resistentes de *Roseobacter denitrificans* y *Synechococcus* spp. se observó una disminución de la tasa de absorción de los fagos, lo cual sugiere cambios en los receptores del hospedero que servían de anclaje a los fagos. Al realizar la proteómica comparativa de cepas susceptibles se observaron cambios significativos en las proteínas de membrana, las cuales fueron desreguladas en las cepas resistentes a fagos, lo cual puede deberse al uso de receptores similares entre fagos y como consecuencia ser una ventaja en el ambiente natural donde las bacterias están expuestas a una alta diversidad de fagos. Sin embargo, estas modificaciones no siempre derivan en una ventaja para las bacterias en el ambiente ya que estos mismos receptores son usados para la asimilación de nutrientes, anclaje al hospedero u otros sustratos, movilidad u otras funciones importantes; dando como consecuencia un decremento de la competitividad de la bacteria (Breitbart, 2012). Middelboe *et al.*, 2009 demostraron que las cepas de *Flavobacterium* resistentes a fagos presentaron una reducción en la habilidad para la asimilación de varias fuentes de carbono y por su parte Gordillo-Altamirano *et al.*, 2021 demostraron que las cepas resistentes a fago de *Acinetobacter baumannii* mostraron una susceptibilidad a antibióticos con respecto a las cepas no expuestas a fago, con lo cual se demuestra una sensibilidad debida a la presión selectiva de fagos. Esto sugiere que el coste metabólico para la adquisición de la resistencia a fagos no solo conlleva a la pérdida de la capacidad metabólica de las cepas, también deriva en una posible sensibilización a agentes antimicrobianos como los antibióticos lo cual abre un abanico de oportunidades para el combate de cepas multirresistentes a antibióticos en salud humana y la industria alimentaria.

1.7. Fagoterapia en acuicultura

Existen una amplia cantidad de trabajos y revisiones que evalúan el papel de los virus en la estabilidad, funcionamiento y diversidad en los ambientes naturales marinos y terrestres, y su potencial como agentes de biocontrol en humanos, agricultura e industria alimentaria (Suttle, 2005, 2007; Weinbauer, 2004; Abedon *et al.*, 2011). Aunque el uso de fagos para el control de infecciones bacterianas en acuicultura ha tenido un despunte en los últimos 20 años, aún es limitada la información acerca de su aplicación para el control de enfermedades bacterianas en sus diversas versiones, individual, en cocteles o en combinación con otros tratamientos. Con respecto al uso de fagos individuales, se ha reportado que estos reducen de forma significativa la mortalidad y presencia de signos de infección en camarones (Alagappan *et al.*, 2010; Lomelí-Ortega & Martínez-Díaz, 2014; Patil *et al.*, 2014), artemia (Martínez-Díaz & Hipólito-Morales, 2013; Lomelí-Ortega *et al.*, 2021), bivalvos (Pereira *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2018), peces (Matsuoka *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2014a; Rørbo *et al.*, 2018, Veyrand-Quirós *et al.*, 2020) y pepinos de mar (Li *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). En todos los casos se observaron efectos benéficos debido a la presencia de fagos en el sistema; sin embargo, en los experimentos solo se evaluó una cepa blanco susceptible y sin la presencia de cepas resistentes, lo cual ocasiona una disminución en la efectividad del tratamiento. Para evitar estos inconvenientes, el uso de cocteles de fagos es una manera sencilla y eficaz de reducir o eliminar a cepas resistentes a fagos. Li *et al.*, (2016), evaluaron la capacidad preventiva de un coctel de tres fagos para el control del patógeno *V. splendidus* en organismos juveniles de pepino de mar *Apostichopus japonicus*. Los autores reportan que el uso preventivo del coctel fue más eficiente que los fagos individuales para controlar la mortalidad asociada a *V. splendidus* al mantener una supervivencia de 82 % de los organismos, lo cual fue un 32 % más efectivo que los tratamientos individuales. En la misma línea de investigación, Zhang *et al.*, (2015) reportaron que el uso combinado de dos fagos específicos contra *V. alginolyticus* y un fago específico contra *V. cyclitrophicus* son capaces de mantener la supervivencia de juveniles de pepino de mar en un 73 % comparado con el 3 % observado en el grupo control sin tratar. Por su parte, Stalin & Srinivasan (2016) aislaron el fago VPP1, capaz de lisar no solo a su cepa blanco *V. harveyi*, sino también son capaces de infectar cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*. Estos fagos fueron usados en coctel durante pruebas de reto con nauplios de *Penaeus monodon*, encontrando que las mayores reducciones en los conteos de *V. harveyi* y las mayores supervivencias de organismos se presentan con la mezcla de los tres fagos.

Aunque el uso de bacteriófagos para el control poblaciones de patógenos es eficaz sin la necesidad de terapias complementarias (Kim *et al.*, 2014, 2017), en microambientes de organismos (intestino, vagina, etc.) no se observa una restauración completa de la comunidad microbiana (Kim *et al.*, 2014, 2017; Vorobey *et al.*, 2017). Esto se debe a que los bacteriófagos están enfocados en eliminar patógenos específicos sin causar ningún cambio en otros microorganismos y/o el ambiente. En contraste, el uso de bacteriófagos y probióticos si puede generar una restauración completa de la composición de la microbiota de organismos (Vorobey *et al.*, 2017); ya que los probióticos pueden tomar los nichos disponibles y proveer beneficios adicionales como: valor agregado al alimento, contribución enzimática a la digestión, inhibición de microorganismos no importantes en los sistemas, y factores que promuevan el crecimiento o incrementen la respuesta del sistema inmune (Wang *et al.*, 2008). Aunado a lo anterior, el uso de bacteriófagos en conjunto con bacterias probióticas para el control de infecciones ha tomado gran interés debido a que ambos ofrecen como ventajas la carencia de producción de sustancias residuales nocivas y eliminación de bacterias resistentes a antibióticos (Marietto-Gonçalves *et al.*, 2011; Woo & Ahn, 2014). Sin embargo, el uso combinado de fagos y probióticos en acuicultura solo se ha evaluado *in vitro* por pocos autores. Baek *et al.*, (2013) demostraron que el uso combinado de fagos y *Bacillus subtilis* posee una alta actividad antimicrobiana contra el patógeno de peces *Edwardsiella tarda*, por lo que sugieren la posibilidad de desarrollar un aditivo alimenticio basado en esta combinación para el tratamiento de enfermedades infecciosas ocasionada por *E. tarda* en peces de cultivo. Quiroz- Guzmán (2013) por su parte, demuestra que el uso combinado de fagos y probióticos en pruebas de reto con *A. franciscana* mejoró la tasa de eclosión de los quistes, la supervivencia de los nauplios, e inclusive redujo los tiempos de eclosión con respecto a aquellos expuestos a cepas patógenas de *V. parahaemolyticus*. Algunos de los logros relacionados con la terapia de bacteriófagos en la acuicultura, incluido el aislamiento de fagos y las posibles aplicaciones, se resumen en la Tabla 3. Esta recopilación de información contribuye a la identificación de algunos de los aspectos más relevantes del uso de fagos como agentes antimicrobianos en la acuicultura.

Tabla 3. Investigación sobre el potencial de bacteriófagos

Producto de acuicultura	Agente etiológico	Bacteriofago	Resultados	Referencia
<i>Anguilla Japonica</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	ET-1	Mortalidad (92,6%) afectados 25 de 27 Cepas de <i>E. tarda</i> y redujo el recuento bacteriano para menos del 0,15%	Wu y Chao (1982)
<i>Seriola quinqueradiata</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>	Siphoviridae PLgY-16, PLgY-30 y PLgW-1	La tasa de supervivencia fue mucho más alto en jurel con fago durante el reto con <i>L. garvieae</i>	Nakai <i>et al.</i> (1999)
<i>Plecoglossus altivelis</i>	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Myoviridae (PPpW-3) and Podoviridae (PPpW-4)	Efecto protector contra <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> inducido experimentalmente demostrando así el uso profiláctico de fagos para prevenir transmisión horizontal del patógeno	Park <i>et al.</i> (2000), Nakai y Park (2002)

<i>Penaeus monodon</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Myoviridae</i> (VHLM)	VHML mostró un estrecho rango de hospedero y un aparente preferencia por <i>V. harveyi</i> en lugar de otros 63 aislados de <i>Vibrio</i> y otros 10 géneros	Oakey y Owens (2000), Oakey <i>et al.</i> (2002)
<i>Oncorhynchus fontinalis</i> formerly, <i>Salvelinus fontinalis</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	HER 110	Retraso de la infección (7 días). Más de uno fago podría infectar la cepa de bacterias y mutantes resistentes a fagos HER 110 fueron sensible a otros fagos, tenía una generación más lento tiempo, y muy bajo éxito de la reposición	Imbeault <i>et al.</i> (2006)
Camarón	<i>Vibrio harveyi</i>	VH1 - VH8	Todos los aislamientos de bacteriófagos (VH1-VH8) provocaron la lisis de las células bacterianas del huésped en 2 h. La curva de propagación para cada fago muestra un tiempo de ráfaga que comenzó entre 1 y 10 h.	Srinivasan <i>et al.</i> (2007)

Larva de <i>Phyllosoma panulirus ornatus</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Siphoviridae</i> (VhCCS-01, VhCCS-02, VhCCS-04, VhCCS-06, VhCCS-17, VhCCS-20)	Los <i>Myoviridae</i> (VhCCS-19 y VhCCS-21) lisogénicos e inducen la producción de bacteriocina en un número limitado de bacterias hospedadoras (<i>V. harveyi</i> cepa 12).	Crothers-Stomps <i>et al.</i> (2010)
Bagre	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>Siphoviridae</i> (UeiDWF, UeiAU y UeiMSLS)	El análisis genómico reveló que se trata de fagos virulentos, sin capacidad de lisogenia o expresión de genes de virulencia.	Carrias <i>et al.</i> (2011)
<i>Salmo salar</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	CHOED	Disminución de la mortalidad del 95% al 30%	Higuera <i>et al.</i> (2013)
<i>Penaeus vannamei</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	A3S y Vpms1	En ambos casos, la aplicación precoz (a las 6 h postinfección) fue eficaz para evitar la mortalidad. Las aplicaciones de fagos retardados (> 6 h después de la infección) obstaculizaron la mortalidad y el progreso de la infección.	Lomeli-Ortega y Martínez-Díaz (2014)

<i>Penaeus vannamei</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	pVp-1	Este fago fue capaz de infectar el 90,9% (20 cepas entre 22 cepas) de las cepas <i>V. parahaemolíticas</i> relacionadas con AHPND / EMS	Woo Jun <i>et al.</i> (2016)
<i>Solea senegalensis</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	AS-A	Los resultados mostraron que luego de 6 h de tratamiento el fago inhibió el crecimiento de <i>A. salmonicida</i> tanto en cultivos discontinuos como en agua de mar en presencia de peces juveniles (≈ 4 y $2.5 \text{ Log PFU mL}^{-1}$, respectivamente)	Silva <i>et al.</i> (2016)
<i>Penaeus vannamei</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Vp1, VP7 y VP9	Los resultados indicaron que los fagos también infectan a <i>V. parahaemolyticus</i> en el intestino del camarón y sus desechos producen una respuesta inmune en los camarones, que pueden combatir cualquier infección no específicamente como estimulantes inmunes.	Alagappan <i>et al.</i> (2016)

<i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>Streptococcus parauberis</i>	Str-PAP-1	El bacteriófago Str-PAP-1 puede usarse para tratar o prevenir la estreptococosis causada por <i>S. parauberis</i> . Además, los efectos de la suplementación dietética con bacteriófago Str-PAP-1 en dosis variables (T1: 1×10^5 ufp / g, T2: 1.5×10^5 ufp / gy T3: 2×10^5 ufp / g) sobre el rendimiento del crecimiento de los peces , se evaluaron la incidencia de infecciones por <i>S. parauberis</i> y la mortalidad de los peces.	Sun Kwon <i>et al.</i> (2017)
<i>Haliotis laevigata</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	vB_VhaS-a y vB_VhaS-tm	Los resultados del bioensayo mostraron que el control negativo y el control de fagos fueron estadísticamente idénticos, con una supervivencia del 100%, pero diferentes del control bacteriano positivo, con una supervivencia del 0%.	Wang <i>et al.</i> (2017)

<i>Artemia franciscana</i>	<i>Vibrio harveyi</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Vpms1, A3S, Aie, F8 y F12	Los resultados también revelaron un mayor éxito de eclosión (100% en ambos casos) y una tasa de supervivencia (de 85 a 89%) en los grupos tratados con cócteles de fagos	Quiroz Guzman <i>et al.</i> (2018)
<i>Apostichopus japonicus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>V. cyclitrophicus</i> y <i>V. splendidus</i>	PVA1, PVc1 y PVS3	Durante el tiempo de cultivo de 48 días, los recuentos totales de <i>Vibrio</i> en los grupos de tratamiento con fagos disminuyeron y se detectaron partículas de fagos en los fluidos celómicos de pepinos de mar durante el tiempo de cultivo.	Zhen Li <i>et al.</i> (2019)
Larvas de peces	<i>Vibrio anguillarum</i>	KVP40	Los tratamientos combinados e individuales se probaron en sistemas de alimentación viva no axénicos (es decir, microalgas Tetraselmis suecica y camarones de salmuera Artemia salina) obtenidos de una unidad comercial de cría de larvas.	Rasmussen <i>et al.</i> (2019)

<i>Pyropia haitanensis</i>	<i>Vibrio mediterranei</i>	vB_VmeM-Yong XC31	La tasa de supervivencia más alta (83%) de CLL infectadas se obtuvo cuando la densidad de <i>V. mediterranei</i> 117-T6 era 108 UFC / ml y la multiplicidad de infección (MOI) del fago XC31 era 1. Zhu <i>et al.</i> (2020)
<i>Apostichopus japonicus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	vB_VpaP_VP- ABTNL-1 y vB_VpaS_VP- ABTNL-2	Los cultivos tratados con fagos in vitro mostraron una inhibición significativa (P <0,05) del crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i> VP-ABTNL en comparación con los grupos no tratados. Ren <i>et al.</i> (2019)
<i>Seriola rivoliana</i>	<i>Photobacterium damselae</i>	vB_Pd_PDCC-1	El uso de fagos durante el desarrollo ontogénico demostró que el uso de fagos, Veyrand- representa una estrategia prometedora para reducir la mortalidad de organismos de cultivo causada por bacterias patógenas. Quirós <i>et al.</i> (2020)

<i>Artemia franciscana</i>	<i>Vibrio campbellii</i>	vB_Vc_SrVc9	vB_Vc_SrVC9 es un fago novedoso y una alternativa ecológica para aplicaciones terapéuticas y fines biotecnológicos porque es estable en diferentes condiciones ambientales. Lomeli-Ortega <i>et al.</i> (2020)
<i>Larimichthys crocea</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	vB_VhaS_PcB-1G	La frecuencia del gen de virulencia <i>toxR</i> alcanzó hasta el 75,9%, mientras que el 63% de las cepas portaban al menos cuatro genes de virulencia. Se aisló un nuevo fago específico de <i>V. harveyi</i> vB_VhaS_PcB-1G de <i>Larimichthys crocea</i> en el Mar de China Oriental. Wu <i>et al.</i> (2021)

2. Diversidad genómica y filogenia de bacteriófagos

La clasificación taxonómica de los taxones de fagos se lleva a cabo por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (Adams, 2017). Aunque la clasificación de fagos se basó históricamente en características como el tipo de genoma (ssDNA, ssRNA, dsDNA o dsRNA), la morfología viral y el rango de hospedadores, actualmente se está sometiendo a una revisión importante, principalmente utilizando métodos basados en genómica. Por ejemplo, el informe de ICTV de 1999 clasificó los fagos en tres familias, 16 géneros y 30 especies, mientras que el informe de 2018 los agrupó en cinco familias, 26 subfamilias, 363 géneros y 1320 especies (https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases). Se han modernizado directrices integrales para la clasificación de fagos y se espera que la lista de taxones de virus aumente sustancialmente en los próximos años (Adriaenssens y Brister, 2017; Dion *et al.*, 2020). Principalmente porque dependiendo de la taxonomía de los mismos, más específicamente del orden, el material genético está empaquetado dentro de la cápside, la cual puede variar en estructuras como poliédrico, filamentoso, pleomórfico o conectado a una cola (Adams 2017). La gran mayoría de los fagos descritos y registrados en bases de datos públicas, son de morfología de cola con un dsDNA dentro del orden de los Caudovirales y comprenden 5 familias Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae, Ackermannviridae, Herelleviridae (Figura 3) (Ackermann 2007).

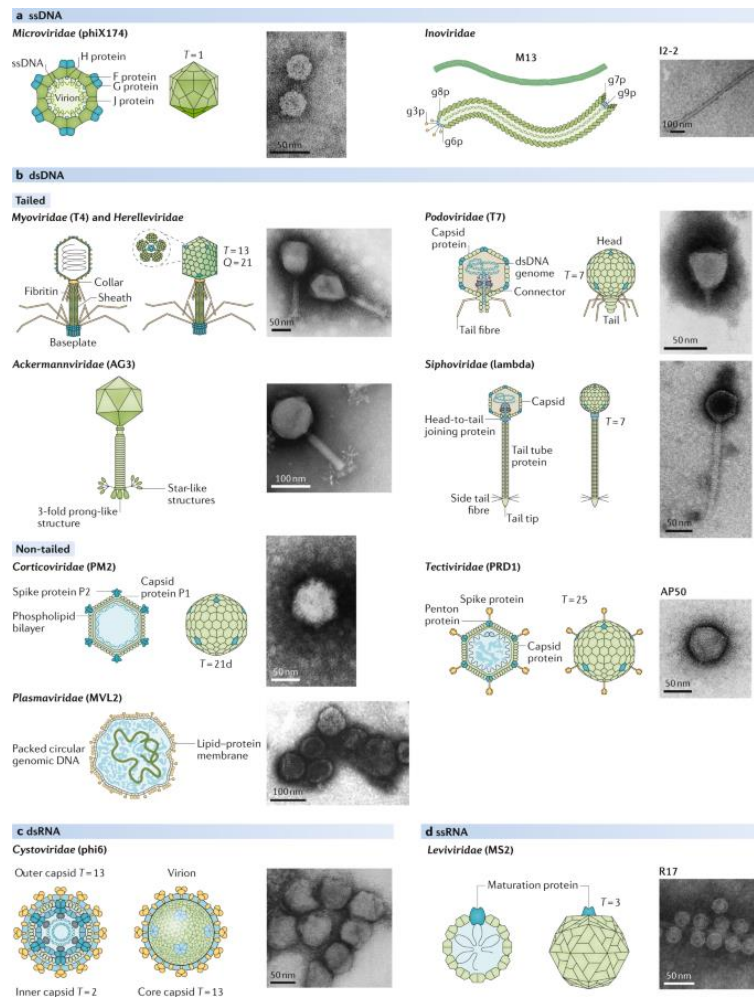


Figura 3. Clasificación de fagos basada en morfología y tipo de genoma. Se muestran una representación esquemática (SR) y una micrografía electrónica de transmisión (TEM) para cada morfología. a) Los Microviridae tienen cápsides icosaédricas y pequeños genomas circulares de ADN monocatenario (ssDNA). El genoma de los fagos filamentosos de la familia Inoviridae está compuesto por una molécula de ssDNA superenrollada circular que está empaquetada dentro de un filamento largo compuesto por miles de copias de la proteína de la cápside principal. b) La mayoría de los fagos caracterizados tienen cola con genomas de ADN bicatenario (dsDNA) y pertenecen al orden Caudovirales. Hasta la fecha, se han descrito cinco familias para este orden: Myoviridae (T4), Podoviridae (T7), Ackermannviridae y Siphoviridae. Herelleviridae, aunque es una familia oficial, comparte la misma morfología que Myoviridae. Los Corticoviridae tienen un genoma de dsDNA circular y una cápside compuesta por una membrana lipídica interna rodeada por MCP. Tectiviridae tienen una cápside icosaédrica, que contiene un genoma de dsDNA lineal y una membrana lipídica interna. Los virus que pertenecen a la familia Plasmaviridae tienen un genoma de dsDNA circular rodeado por una envoltura lipídica y sin cápside. c) Cystoviridae tiene un genoma de ARN bicatenario tri-segmentado (ARNdc) contenido dentro de una cápside esférica con tres capas estructurales: una membrana lipídica externa y una cápside interna de dos capas. d) Los leviviridae tienen un genoma ssRNA que codifica solo cuatro proteínas y una cápside con geometrías icosaédricas y esféricas. Tomado de Dion *et al.*, (2020).

El número y la diversidad de bacteriófagos que se identifican cada día incrementa a un ritmo acelerado, de hecho el número de genomas completos depositados en bases de datos como GenBank, se ha duplicado en los últimos años, gracias a los estudios de investigación, los avances en la secuenciación y análisis de los genomas de los fagos, incluyendo el ensamblaje, anotación y uso

(Adams 2017) y aunque los fagos son considerados inocuos para los mamíferos y plantas, no existe una guía oficial para la evaluación de la seguridad genética de los fagos antes de su uso clínico, y gran parte de las evaluaciones propuestas para su uso como agente terapéuticos en humanos, se encuentran en una etapa experimental, mientras son aprobados por organismos como la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) en Estados Unidos. Esta falta de directrices puede limitar su avance como agentes terapéuticos en humanos. En la actualidad, aunque se han desarrollado diferentes herramientas para la caracterización de los genomas de los fagos, se necesitan análisis complementarios para la evaluación de la seguridad de los genomas, principalmente por la interpretación errónea de datos poco confiables que terminan en bases de datos públicas.

Para poder abordar este reto, se han propuesto puntos de control básicos clasificados en dos categorías, obtención de un genoma de alta calidad y evaluación sólida de la composición genética (Philipson *et al.*, 2018). La calidad de un genoma puede ser definida por la integridad de las secuencias que lo componen (parcial o completa), y la categoría recomendada para los virus que se utilizan en la investigación (como en el desarrollo de vacunas) debe ser considerado como completo, principalmente por la naturaleza propia del genoma, que varía entre los 3 mil (Friedman *et al.*, 2009) y 650 mil (Michniewski *et al.*, 2021) pares de bases (pb), en la que debe existir una única secuencia consenso que represente el 100% del genoma con todos los marcos de lectura abierto (ORF) identificados (Figura 4) (Ladner *et al.*, 2001). Este proceso, conocido como anotación, representa un paso crucial dentro del reporte final del genoma propuesto, independientemente de su uso final como terapéutico o biotecnológico.

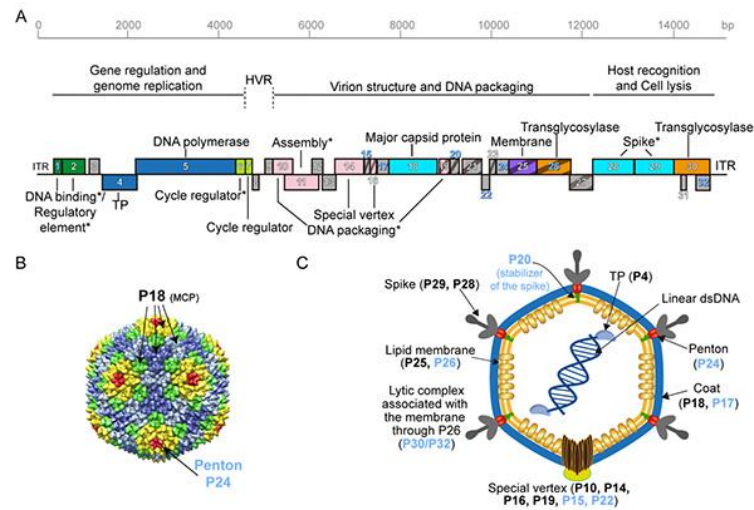


Figura 4. Genoma del virus Bam35 (A) Mapa genético del fago Bam35. Los rectángulos corresponden a los ORF predichos en el genoma Bam35. (B) Modelo de la capsida del virus Bam35, basado en la estructura cristalográfica del *Alfatectivirus* PRD1. (C) Modelo propuesto para la partícula viral Bam35. Representación esquemática de la partícula viral Bam35 en la que se indica la localización propuesta o conocida de cada una de sus proteínas. (Modificado de Berjón-Otero *et al.*, 2017).

La importancia del genoma, resalta a partir de la clasificación de los fagos en torno a su 'estilo de vida', ya que pueden dividirse en varios grupos con respecto al resultado final de la infección, en términos generales, los grupos más importantes son líticos, caracterizados por la eliminación de la bacteria y liberación de la progenie del fago, así como lisogénicos, los cuales tienen una capacidad lítica pero también 'templada', en la cual, el fago integra su ADN en el ADN de la bacteria para convertirse en un profago, volviéndose inactivo y suprimiendo las propiedades antibacterianas típicas que presenta durante el estado lítico. La elección se produce poco después de la infección y depende, en muchos de los casos, de la actividad fisiológica propia de la bacteria (Krylov 2001). Los genes del fago que controlan la vía lítica pueden ser reprimidos por una proteína-represora que se une a regiones específicas del ADN y bloquea la unión de la ARN polimerasa a sitios específicos de los promotores, lo que impide la transcripción de los genes cuyos productos están implicados en la vía lítica.

La identificación temprana del estilo de vida del fago es crucial durante su proceso de selección para emplearse como alternativa terapéutica, ya que se ha demostrado la relación mutualista que existe entre los profagos y las bacterias, en los que se aumenta la capacidad de defensa bacteriana, principalmente por la presencia de enzimas codificadas por los fagos como las integrasas,

aumentando el riesgo de transferencia de genes que ayuden a la bacteria a defenderse y siendo una razón suficiente para evitar este tipo de fagos en la terapia, ya que, la transferencia horizontal de genes del fago al huésped y viceversa está bien documentada (Canchaya *et al.*, 2003) Así como las integrasas, existen elementos genéticos adicionales que tras su identificación, descalifican a los fagos para ser utilizados como agentes terapéuticos, entre ellos, genes que codifican factores de virulencia y resistencia bacteriana, toxinas o elementos transductibles. Tanto la virulencia como el estilo de vida, pueden ser evaluados por técnicas experimentales y la presencia o ausencia de genes que promuevan la resistencia bacteriana, por técnicas computacionales.

Una de las primeras herramientas empleada para la análisis de estilo de vida del fago fue PHACTS (Phage Classification Tool Set), clasificando al bacteriófago en lítico o lisogénico dependiendo de su proteoma (Ladner *et al.*, 2014), así como PhageAI (Tynecki *et al.*, 2020), utilizando la mayor cantidad de genomas de fagos disponibles en bases de datos y clasificando entre lítico o lisogénico a partir del genoma completo, empleando técnicas más avanzadas de clasificación basadas en aprendizaje automático. Por su parte, la identificación de genes de resistencia, puede llevarse a cabo, tras una comparación del genoma completo contra bases de datos especializadas en genes de resistencia; CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (Alcock *et al.*, 2020) y VFDB (Virulence Factor Database) (Chen *et al.*, 2005) son dos ejemplos, que permiten la identificación de genes determinantes de resistencia y antibióticos asociados. Por estas, y otras razones, la secuenciación del genoma completo se ha convertido en obligatorio para la aprobación reglamentaria de cualquier aplicación sanitaria o alimentaria de fagos o sus derivados (Hagens *et al.*, 2010). Ya que, además de que los fagos líticos o las enzimas que producen, son las ideales para la terapia génica, la única forma de utilizar fagos lisogénicos, sería a partir de técnicas modernas de ingeniería genética o biología sintética, convirtiendo al fago en no-lisogénico, bloqueando o eliminando al gen que codifica para la integrasa y otros elementos genéticos no deseados (Monteiro *et al.*, 2019) Lo que podría suponer una nueva estrategia para explorar el uso de fagos templados para la terapia contra las infecciones bacterianas.

2.1 La búsqueda de los mejores candidatos

Desde 1977, a partir del primer genoma completo del bacteriófago $\Phi \times 174$, la secuenciación e identificación de los nuevos fagos ha incrementado numerosamente durante las últimas dos décadas, por lo que los investigadores actuales se enfrentan a una variedad de plataformas de secuenciación y opciones de ensamblaje, así como la gran cantidad de datos que producen (17). La secuenciación de próxima generación se ha convertido en el método preferido para la secuenciación de los fagos, principalmente por su costo por base y el resultado de alta calidad comparado con otras plataformas. Philipson *et al* (2018) han propuesto una guía mínima basada en sus investigaciones para la evaluación de los fagos que pretenden ser administrados en la terapia, incluyendo (i) la obtención de un genoma completo de alta calidad, (ii) identificación de los marcos de lectura abierto (ORF), la anotación de los genes con una función en consenso comprobado por diferentes herramientas, (iv) la identificación de marcadores genéticos deletéreos, (v) la verificación de que el genoma es representativo para la población y finalmente (vi) el análisis de posibles contaminantes (figura 5). Considerando, además, los retos de manejo y secuenciación de las muestras, por ejemplo, los fagos (especialmente líticos), tienen genomas notoriamente metilados porque las bacterias poseen sistemas de modificación y restricción para salvaguardar la integridad de sus genomas de ADN invasor. Incluso, una gran parte de los genomas de los fagos, contienen estructuras complejas como repeticiones directas o invertidas que son problemáticas para el ensamblaje.

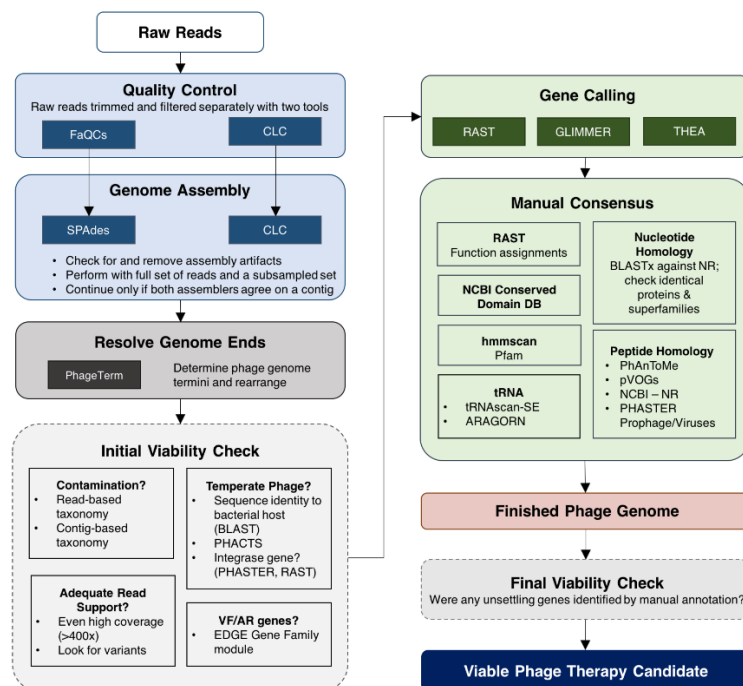


Figura 5. Flujo de trabajo de caracterización de fagos. Esta canalización es una representación simplificada de herramientas y métodos utilizados para obtener genomas de fagos de alta calidad que se consideran candidatos viables para la terapia de fagos. La canalización comienza con lecturas secuenciadas en Illumina. Para reducir el sesgo potencial introducido por las herramientas bioinformáticas, el control de calidad y el ensamblaje del genoma se llevan a cabo utilizando dos pipelines en paralelo. La secuencia final del genoma se obtiene después de resolver los extremos del genoma. Los puntos de control de viabilidad clave están delineados con bordes discontinuos. En el control de viabilidad inicial, los fagos se evalúan en busca de genes problemáticos (resistencia a los antimicrobianos (AMR), factores de virulencia (FV), toxinas) y estilo de vida. Si un candidato pasa la verificación de viabilidad inicial, se aplica un enfoque combinatorio para identificar marcos de lectura abiertos seguido de una anotación manual rigurosa. Se realiza una verificación final después de completar la anotación. Los candidatos a fagos que pasan el punto de control final se consideran seguros para su uso potencial uso. Tomado de Philipson *et al.*, (2018)

Dentro las tecnologías que han sido empleadas para la secuenciación, se encuentran Sanger, Illumina, PacBio y Nanopore, con lecturas desde los 150 hasta 60 mil pb, aumentando o disminuyendo su error dependiendo de la técnica utilizada. Estas plataformas de secuenciación difieren principalmente en su composición química, pero en general se basan en los mismos tres pasos: preparación de la biblioteca, amplificación y secuenciación del dsDNA. En el caso de los fagos de ARN, el ADN complementario (ADNc) debe ser generarse mediante transcripción inversa, ya sea antes del paso de preparación de la biblioteca o utilizando kits que están optimizados para la secuenciación de ARN y pueden proporcionar información sobre si el genoma está formado por dsRNA o ssRNA (Loman *et al.*, 2012).

Tras la obtención de un genoma completo de alta calidad, múltiples herramientas pueden ser utilizadas para el ensamblaje y la identificación de los marcos de lectura abierto; Spades (19),

Unicycler (Wick *et al.*, 2017), y Velvet (Zerbino 2010), basados en Gráfico de Bruijn, son ejemplos de ensambladores. GeneMark (Besemer & Borodovsky 2005), Glimmer (Delcher *et al.*, 2007), y Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010), son parte de los algoritmos de predicción de genes más empleados para procariotas, basados en la mejora de la predicción de la estructura del gen, reconocimiento del sitio de iniciación de la traducción y reducción de los falsos positivos. La anotación, además de proporcionar información sobre genes no deseados como las integrasas, han permitido identificar genes específicos utilizados por herramientas taxonómicas, como los genes estructurales de la cápside viral (Sullivan *et al.*, 2008). Herramientas adicionales que permiten una predicción y anotación automática como Prokka (Seemann 2014) han facilitado el manejo de datos genómicos. Cada una de estas herramientas pueden utilizarse a través de su interfaz web, utilizando plataformas como Galaxy (Jalili *et al.*, 2020) o a través de la línea de comandos en Linux. Para cualquier método de predicción, es recomendable una curación manual de los genes y proteínas que conforman el genoma, a fin de asegurar la reducción de errores, que terminan en bases de datos públicas (Figura 6).

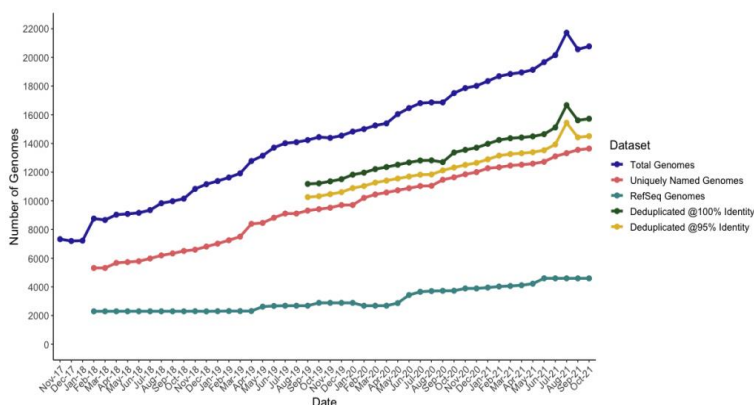


Figura 6. Identificación de sesgos a gran escala en la colección actual de genomas de fagos cultivados figura Tomada de <http://millardlab.org/>

2.2 Diversidad genómica y metagenómica viral

2.2.1 Número de genomas completos

De acuerdo con el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), hay 8.437 genomas de fagos completos divididos en 12 familias (según la clasificación de ICTV en ese momento) y un grupo no clasificado (figura 7a). En esta base de datos podemos encontrar que más de la mitad de ellos son miembros de la familia *Siphoviridae*. Esta sobrerrepresentación se debe en gran parte al aislamiento y secuenciación del genoma de 1.537 sifófagos que infectan a *Mycobacterium*

smegmatis del programa SEA-PHAGES (Alianza de Educación Científica-Cazadores de Fagos en Genómica Avanzada y Ciencia Evolutiva) (Tuajuanda *et al.* 2014). *Myoviridae* y *Podoviridae* representan el 17% y el 12% del total de fagos, respectivamente, lo que hace que *Caudovirales* (que también comprende *Herelleviridae* y *Ackermannviridae*) sea el grupo de fagos más abundante (> 85%) en las bases de datos genómicas públicas.

Esta representación tan desproporcionada de fagos de dsDNA probablemente disminuirá pronto debido a la presencia nuevos fagos. Por ejemplo, el grupo de virus bacterianos no clasificados dentro de la base de datos del NCBI consiste en fagos descubiertos a través de proyectos metagenómicos que aún no se han aislado o que se han propagado muy recientemente en un hospedador bacteriano. Parte de este último grupo incluye 283 fagos de dsDNA sin cola, que infectan a la omnipresente familia bacteriana *Vibrionaceae* (Kauffman, *et al.* 2018).

2.2.2 Rango de genoma

Los fagos tienen una amplia gama de tamaños de genomas (figura 7b). Hasta ahora, el genoma más pequeño informado hasta la fecha es el del fago L5 de *Leuconostoc*, con solo 2.435 pb. En el otro extremo del espectro, se está caracterizando un número cada vez mayor de fagos jumbo (> 200 kb) que muestran características genómicas únicas 58. Su gran tamaño de genoma permite que los fagos jumbo porten genes involucrados en la replicación y el metabolismo de nucleótidos que están ausentes en los más pequeños genomas de fagos. Por ejemplo, el jumbo fago vB_Pd_PDCC-1 el cual tiene un tamaño de 237 509 bp, el cual presenta organización atípica porque los genes con funciones asociadas no muestran una sintenia fuerte y, en cambio, están más dispersos (Veyrand-Quirós *et al.* 2020). Finalmente, un nuevo grupo de fagos con los genomas más grandes jamás registrados hasta la fecha, llamados megafagos (> 540 kb), fueron descubiertos son ubicuos y se describen a partir de una variedad de microbiomas que van desde el intestino de los animales hasta el suelo y los sistemas de agua dulce. Sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado ningún megafago marino completo. Sin embargo, uno de estos genomas incluía un nuevo megafago, Mar_Mega_1 de > 650 Kb, lo que lo convierte en uno de los genomas de fagos más grandes reunidos hasta la fecha. Utilizando enfoques filogenéticos y de red. El análisis genómico mostró que Mar_Mega_1 comparte relativamente pocos homólogos con sus parientes más cercanos, pero, al igual que con otros megafagos, Mar_Mega_1 contenía una variedad de genes metabólicos auxiliares responsables del metabolismo del carbono y la biosíntesis de nucleótidos, incluida una isocitrato

deshidrogenasa (Idh) dependiente de NADP y nicotinamidenucleótido amidohidrolasa (PncC), que no se han identificado previamente en megafagos. Mar_Mega_1 fue abundante en una muestra de viroma marino y los fagos relacionados son muy frecuentes en los océanos (Slawomir *et al.* 2021).

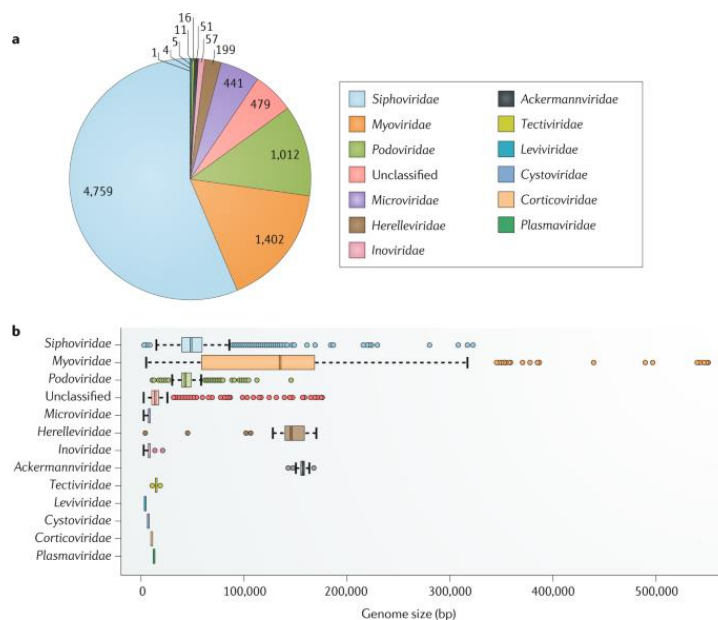


Figura 7 Número de genomas completos y distribución del tamaño del genoma en familias de fagos. Se muestra el número de genomas completos (a) y la distribución del tamaño del genoma (b) en la base de datos de nucleótidos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) a septiembre de 2019. La asignación de cada fago a una familia se realizó utilizando la base de datos de taxonomía NCBI. El grupo no clasificado combina "Caudovirales no clasificados", "fagos de ADN bicatenario no clasificados" y "virus bacterianos no clasificados". Este grupo no clasificado es el cuarto más grande, lo que enfatiza el creciente número de fagos descubiertos a través de la metagenómica viral para los cuales no se puede asignar una familia en base a la información de la secuencia. Entre el orden Caudovirales, Herelleviridae y Ackermannviridae son las familias más homogéneas en términos de tamaño del genoma. Lo más probable es que esto se deba a que estas dos familias se crearon después de análisis genómicos en lugar de similitudes morfológicas. Tomado de Moira *et al.* (2020).

3. Conclusión

La mayoría de los fagos, destinados a la terapia con fagos, por lo regular se aíslan mediante variaciones del protocolo de enriquecimiento clásico. Se aísla un subconjunto de fagos usando una mezcla de hospedadores con la intención de obtener fagos de rango de hospedador más amplio y se han desarrollado varios protocolos específicamente para seleccionar fagos con rango de hospedador aumentado o fagos polivalentes. Si bien la mayoría de los grupos usan métodos que se basan en el crecimiento de fagos para probar el rango de hospedadores, todavía hay algunos que confían solo en pruebas puntuales menos precisas, pero fáciles de realizar. Uno de los desafíos con la caracterización posterior al aislamiento son los métodos automatizados para la investigación sistemática de los fagos y otros elementos móviles de ADN en las secuencias del genoma bacteriano disponibles para comprender su papel en la evolución del genoma bacteriano. Esto debido al contenido de nucleótidos y genes que son extremadamente diversos en los genomas de fagos, los cuales pueden estar interconectados desde una perspectiva evolutiva y varios factores que impulsan tasas altas o bajas de intercambio de genes. En esta revisión, hemos destacado que la investigación de fagos será fundamental para comprender su aplicación durante la fagoterapia, impactando en el desarrollo de una acuicultura más sustentable. El éxito dependerá en gran medida de enfoques multidisciplinarios integradores en un campo que, hasta hace poco, ha estado dominado por el pensamiento reduccionista.

5. Bibliografía

- Abedon, S.T. (2011). Lysis from without. *Bacteriophage* 1:46–49.
- Ackermann, H. W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol.* 152, 227–243.
- Adams Michael J., Elliot J. Lefkowitz, Andrew M. Q. King, Balázs Harrach, Robert L. Harrison, Nick J. Knowles, Andrew M. Kropinski, Mart Krupovic, Jens H. Kuhn, Arcady R. Mushegian, Max L. Nibert, Sead Sabanadzovic, Hélène Sanfaçon, Stuart G. Siddell, Peter Simmonds, Arvind Varsani, Francisco Murilo Zerbini, Richard J. Orton, Donald B. Smith, Alexander E. Gorbalenya & Andrew J. Davison. (2017). 50 years of the International Committee on Taxonomy of Viruses: progress and prospects. *Arch. Virol.* 162, 1441–1446
- Alagappan, K.M., B. Deivasigamani, S.T. Somasundaram & S. Kumaran. (2010). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Specific Phages from Shrimp Ponds in East Coast of India. *Current microbiology*, 61(4), 235-240.
- An Sung Kwon, Bong Jo Kang, Soo Youn Jun, Seong Jun Yoon, Jae Hwan Lee, & Sang Hyeon Kang. (2017). Evaluating the effectiveness of *Streptococcus parauberis* bacteriophage Str-PAP-1 as an environmentally friendly alternative to antibiotics for aquaculture. *Aquaculture*. 468 (1) 464-470.
- Baek, M.S., Y.S. Hwang & S. Choi. (2013). Mixture of *Edwardsiella tarda* specific Bacteriophage and *Bacillus subtilis* KM-1enhanced bactericidal activity against *Edwardsiella tarda*. *J. Fish Pathol.* 26(3), 185-191.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology*, 19(5), 455–477.
- Bastian Barker, Rasmussen, Panos G. Kalatzis, Mathias Middelboe, & LoneGram. (2019). Combining probiotic *Phaeobacter inhibens* DSM17395 and broad-host-range vibriophage KVP40 against fish pathogenic vibrios. *Aquaculture*. 513, 734415.
- Besemer, J., & Borodovsky, M. (2005). GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses. *Nucleic acids research*, 33(Web Server issue), W451–W454.
- Binetti, A.G., Quiberoni, A. & Reinheimer, J.A., (2002). Phage adsorption to *Streptococcus thermophilus*. Influence of environmental factors and characterization of cell-receptors. *Food Res. Int.*, 35(1), 73–83.
- Borody, T.J. & A. Khoruts. 2012. Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 88–96.
- Breitbart, M. (2012). Marine viruses: truth or dare. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4: 425-448.
- Breitbart, M. 2012. Marine viruses: truth or dare. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4: 425--448.
- Brian P Alcock, Amogelang R Raphenya, Tammy T Y Lau, Kara K Tsang, Mégane Bouchard, Arman Edalatmand, William Huynh, Anna-Lisa V Nguyen, Annie A Cheng, Sihan Liu, Sally Y Min, Anatoly Miroshnichenko, Hiu-Ki Tran, Rafik E Werfalli, Jalees A Nasir, Martins Oloni, David J Speicher, Alexandra Florescu, Bhavya Singh, Mateusz Faltyń, Anastasia Hernandez-Koutoucheva, Arjun N Sharma, Emily Bordeleau, Andrew C

- Pawlowski, Haley L Zubyk, Damion Dooley, Emma Griffiths, Finlay Maguire, Geoff L Winsor, Robert G Beiko, Fiona S L Brinkman, William W L Hsiao, Gary V Domselaar & Andrew G McArthur. (2020). CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, 48(D1), D517–D525.
- Buckingham SD. (2010). Next Generation Data Explosion. *Lab Times.*;1:52–3.
- Canchaya C, Fournous G, Chibani-Chennoufi S, Dilmann ML & Brussow H. (2003) Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol* 6: 417-424. 10.1016/S1369-5274(03)00086-9
- Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y., & Jin, Q. (2005). VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic acids research*, 33(Database issue), D325–D328.
- Chibani--Chennoufi, S., A. Bruttin, M.L. Dillmann & H. Brüssow. 2004. Phage--host interaction: an ecological perspective. *Journal of bacteriology*, 186(12): 3677-- 3686.
- Comeau, A.M., A.M. Chan & C.A. Suttle. (2006). Genetic richness of vibriophages isolated in a coastal environment. *Environ. Microbiol.* 8, 1164–1176.
- Delcher, A. L., Bratke, K. A., Powers, E. C., & Salzberg, S. L. (2007). Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(6), 673–679.
- Dion, M.B., Oechslin, F. & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat Rev Microbiol* 18, 125–138 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J. & Berekzi, N. (2017). A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. *Viruses*, 9, 50.
- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J. & Berekzi, N. 2017. A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. *Viruses*, 9, 50.
- Drulis-Kawa, Z., G. Majkowska--Skrobek, B. Maciejewska, A.S. Delattre & R. Lavigne. 2012. Learning from bacteriophages—advantages and limitations of phage and phage--encoded protein applications. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 699– 722.
- Drulis-Kawa, Z., G. Majkowska-Skrobek, B. Maciejewska, A.S. Delattre & R. Lavigne. (2012). Learning from bacteriophages—advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 699– 722.
- Egan, S. & M. Gardiner. 2016. Microbial dysbiosis: rethinking disease in marine ecosystems. *Frontiers in microbiology*, 7, 991.
- Faith, J.J., F.E. Rey, D. O'donnell, M. Karlsson, N.P. McNulty, G. Kallstrom, A.L. Goodman & J.I. Gordon. 2010. Creating and characterizing communities of human gut microbes in gnotobiotic mice. *The ISME journal*, 4(9), 1094.
- FAO (2019a). A Quarterly Update on World Seafood Markets April 2019 Issue,with January–December 2018 Statistics. Available online at: <http://www.fao.org/3/ca5307en/ca5307en.pdf>
- FAO(2019b). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 (SOFIA). Available online at: <http://www.fao.org/3/i9540en/I9540EN.pdf>
- Fennema, O.R. (1996) *Food Chemistry*, 3rd edn. New York, NY, USA: Marcel Dekker, Inc.

- Flores, V., C. Fernández & M. Medina, (2019). Aislamiento y evaluación de la efectividad de bacteriófagos aislados de ambiente marino y su efecto en el control del crecimiento bacteriano. *Boletín Instituto del Mar de Perú* 34 (1): 151-164.
- Forterre, P. & D. Prangishvili. 2009. The origin of viruses. *Research in microbiology*, 160(7): 466-472.
- Friedman SD, Genthner FJ, Gentry J, Sobsey MD & Vinje J. (2009). Gene mapping and phylogenetic analysis of the complete genome from 30 single-stranded RNA male-specific coliphages (family Leviviridae) *J Virol.*;83:11233–11243.
- Gill, J. J., Sabour, P., & Griffiths, M. (2010). “Practical and theoretical considerations for the use of bacteriophages in food systems,” in *Bacteriophages in the Control of Food-and Waterborne Pathogens*, eds P. Sabour and M. Griffiths (Washington, DC: ASM Press), 217–235.
- Gon Choudhury, T., V.T. Nagaraju, S. Gita, A. Paria & J. Parhi. 2017. Advances in Bacteriophage Research for Bacterial Disease Control in Aquaculture, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 1--13
- Gordillo Altamirano, F., Forsyth, J.H., Patwa, R. Kostoulias, X., Trim, M, Subedi, D., Archer, S.K., Morris, F.C., Oliveira, C., Kielty, L., Korneev, D., O’Bryan, M.K., Lithgow, T.J., Peleg, A.Y. & Barr, J.J. (2021). Bacteriophage-resistant *Acinetobacter baumannii* are resensitized to antimicrobials. *Nat Microbiol* 6, 157–161
- Huang, C., Y. Zhang & N. Jiao. (2010). Phage resistance of a marine bacterium, *Roseobacter denitrificans*. *Curr. Microbiol.*, 61:141–47
- Hagens S & Loessner MJ. (2010). Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Curr Pharm Biotechnol.*;11:58–68.
- Monteiro R, Pires DP, Costa AR & Azeredo J. (2019). Phage therapy: going temperate? *Trends Microbiol* 27:368–378.
- Hanlon, G.W. 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30: 118-128.
- Hongyu Ren, Zhen Li, Yongping Xu, Lili Wang & Xiaoyu Li. (2019). Protective effectiveness of feeding phage cocktails in controlling *Vibrio parahaemolyticus* infection of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture*. 530, 322-329.
- Hyatt, D., Chen, G. L., Locascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, 11, 119.
- Hyman P, & Abedon ST. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol*. 70: 217–248.
- Jalili, V., Afgan, E., Gu, Q., Clements, D., Blankenberg, D., Goecks, J., Taylor, J., & Nekrutenko, A. (2020). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2020 update. *Nucleic acids research*, 48(W1), W395–W402.
- Jepson, C.D., & March, J.B. (2004) Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. *Vaccine* 22:2413–2419.
- Jin Woo Juna, Jee Eun Hanb, Kathy F.J. Tangb, Donald V. Lightnerb, Jaehoon Kimc, Sang Won Seoc, & Se Chang Parka. (2016). Potential application of bacteriophage pVp-1: Agent combating *Vibrioparahaemolyticus* strains associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Aquaculture*. 457 (20) 100-103.

- Junkai Zhu, Mengya Xu, Qiqin Liu, Dengfeng Li, Rui Yang & Haimin Chen. (2021). Bacteriophage therapy on the conchocelis of *Pyropia haitanensis* (Rhodophyta) infected by *Vibrio mediterranei* 117-T6. *Aquaculture* 531 735853
- Kalatzis, P.G., R. Bastías, C. Kokkari & P. Katharios. (2016). Isolation and Characterization of Two Lytic Bacteriophages, ϕ St2 and ϕ Grn1; Phage Therapy Application for Biological Control of *Vibrio alginolyticus* in Aquaculture Live Feeds. *PLoS ONE* 11(3): e0151101.
- Kauffman Kathryn M , Fatima A Hussain, Joy Yang, Philip Arevalo, Julia M Brown, William K Chang, David VanInsberghe, Joseph Elsherbini, Radhey S Sharma, Michael B Cutler, Libusha Kelly & Martin F Polz. (2018). A major lineage of non-tailed dsDNA viruses as unrecognized killers of marine bacteria. *Nature* 554, 118–122.
- Khan-Mirzaei M. & A.S. Nilsson. (2015). Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLoS One*, 10(3):e0118557.
- Kim, H. J., Jun, J. W., Giri, S. S., Chi, C., Yun, S., Kim, S. G., & Park, S. C. (2018). Complete Genome Sequence of a Bacteriophage, pVco-5, That infects *Vibrio coralliilyticus*, which causes bacillary necrosis in Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Larvae. *Genome announcements*, 6(2), e01143-17.
- Kim, J.S., A. Hosseindoust, S.H. Lee, Y.H. Choi, M.J. Kim, J.H. Lee, I.K. Kwon, & B.J. Chae. (2017). Bacteriophage cocktail and multi-strain probiotics in the feed for weanling pigs: effects on intestine morphology and targeted intestinal coliforms and *Clostridium*. *Animal*, 11(1), 45-53.
- Kim, K.H., S.L. Ingale, J.S. Kim, S.H. Lee, J.H. Lee, I.K. Kwon & B.J. Chae. (2014). Bacteriophage and probiotics both enhance the performance of growing pigs but bacteriophage are more effective. *Anim. Feed Sci. Tech.* 196, 88-95.
- Knies, J. L., Kingsolver, J. G., & Burch, C. L. (2009). Hotter is better and broader: thermal sensitivity of fitness in a population of bacteriophages. *The American Naturalist*, 173(4), 419-430.
- Krylov, V. N. (2001). *Russian Journal of Genetics*, 37(7), 715–730.
- Kumarappan Alagappan, Valliappan Karuppiah, & Balaraman Deivasigamani. (2016). Protective effect of phages on experimental *V. parahaemolyticus* infection and immune response in shrimp (Fabricius, 1798). *Aquaculture*. 453 (20), 86-92
- Kutter, E. & A. Sulakvelidze. (2004). *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press. Florida, EEUU. 485 p.
- Kutter, E. & A. Sulakvelidze. 2004. *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press. Florida, EEUU. 485 p.
- Labrie, S.J., J.E. Samson & S. Moineau. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 317–327
- Ladner Jason T, Brett Beitzel, Patrick S G Chain, Matthew G Davenport, Eric F Donaldson, Matthew Frieman, Jeffrey R Kugelman, Jens H Kuhn, Jules O'Rear, Pardis C Sabeti, David E Wentworth, Michael R Wiley, Guo-Yun Yu, Threat Characterization Consortium; Shanmuga Sozhamannan, Christopher Bradburne & Gustavo Palacios. (2014). Standards for sequencing viral genomes in the era of high-throughput sequencing. *MBio* , 5, e01360-14
- Lenski, R.E. & B.R. Levin. (1985). Constraints on the coevolution of bacteria and virulent phage: a model, some experiments, and predictions for natural communities. *American Naturalist*, 585-602.

- Lenski, R.E. & B.R. Levin. 1985. Constraints on the coevolution of bacteria and virulent phage: a model, some experiments, and predictions for natural communities. *American Naturalist*, 585--602.
- Li, Z., J. Zhang, X. Li, X. Wang, Z. Cao, L. Wang, & Y. Xu. (2016). Efficiency of a bacteriophage in controlling *Vibrio* infection in the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture*, 451, 345-352.
- Li, Z., Song, Y., Wang, X., Zhang, J., Wang, L., Li, X., & Xu, Y. (2017). Using Phage PSM-1 to Control *Shewanella marisflavi* Infection in Juvenile Sea Cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 48(1), 113-121.
- Loman Nicholas J , Raju V Misra, Timothy J Dallman, Chrystala Constantinidou, Saheer E Gharbia, John Wain, Mark J Pallen. (2012). Performance comparison of benchtop highthroughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 30:434–439.
- Lomelí-Ortega, C. O., Martínez-Sández, A. J., Barajas-Sandoval, D. R., Reyes, A. G., Magallón-Barajas, F., Veyrand-Quiros, B., & Quiroz-Guzmán, E. (2021). Isolation and characterization of vibriophage vB_Vc_SrVc9: an effective agent in preventing *Vibrio campbellii* infections in brine shrimp nauplii (*Artemia franciscana*). *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 36-49.
- Lomelí-Ortega, C.O. & S.F. Martínez-Díaz. (2014). Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture*, 434, 208-211.
- Marietto-Gonçalves, G.A., E.T. Lima, T.C. Donato, T.S. Rocha, L.E. Cisneros-Álvarez, J. Lopes-Sequeira & R.L. Andreatti-Filho. (2011). Eradication of *Salmonella typhimurium* in broiler chicks by combined use of P22 bacteriophage and probiotic. *Int. J. Microbiol. Res.* 3(2), 4-9.
- Martinez-Diaz, S. F. & A. Hipólito-Morales. (2013). Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the vibriosis of brine shrimp. *Aquaculture*, 400, 120-124.
- Matsuoka, S., Hashizume, T., Kanzaki, H., Iwamoto, E., Park, S. C., Yoshida, T., & Nakai, T. (2007). Phage therapy against β -hemolytic streptococcosis of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*.
- Michniewski S., Branko Rihtman, Ryan Cook, Michael A. Jones, William H. Wilson, David J. Scanlan & Andrew Millard. (2021). A new family of “megaphages” abundant in the marine environment. *ISME COMMUN.* 1, 58 *Microbiol.*, 5: 801-812.
- Middelboe, M. & P. Lyck. (2002). Regeneration of dissolved organic matter by viral lysis in marine microbial communities. *Aquat. Microb. Ecol.*, 27:187–94
- Middelboe, M. & P. Lyck. 2002. Regeneration of dissolved organic matter by viral lysis in marine microbial communities. *Aquat. Microb. Ecol.*, 27:187–94
- Middelboe, M., K. Holmfeldt, L. Riemann, O. Nybroe & J. Haaber. (2009). Bacteriophages drive strain diversification in a marine Flavobacterium: implications for phage resistance and physiological properties. *Environ. Microbiol.*, 11:1971–82
- Moïra B. Dion, Frank Oechslin and Sylvain Moineau. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat Rev Microbiol* 18, 125–138
- Obeng, N., A.A. Pratama, & J.D. van Elsas. (2016). The significance of mutualistic phages for bacterial ecology and evolution. *Trends in microbiology*, 24(6): 440- 449.

- Pal, S. 2015. Phage Therapy an alternate disease control in Aquaculture: A review on recent advancements. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science. 8(9): 68-81.
- Patil, J.R., S.N. Desai, P. Roy, M. Durgaiyah, R.S. Saravanan, & A. Vipra. (2014). Simulated hatchery system to assess bacteriophage efficacy against *Vibrio harveyi*. Dis. Aquat. Organ. 112: 113–119
- Pereira, C., Moreirinha, C., Teles, L., Rocha, R. J., Calado, R., Romalde, J. L., & Almeida, A. (2017). Application of phage therapy during bivalve depuration improves *Escherichia coli* decontamination. Food microbiology, 61, 102-112.
- Philipson, C. W., Voegtly, L. J., Lueder, M. R., Long, K. A., Rice, G. K., Frey, K. G., Biswas, B., Cer, R. Z., Hamilton, T., & Bishop-Lilly, K. A. (2018). Characterizing Phage Genomes for Therapeutic Applications. *Viruses*, 10(4), 188.
- Pirisi, A. (2000) Phage therapy – advantages over antibiotics? The Lancet 356: 1418.
- Pope, W. H., Haase-Pettingell, C., & King, J. (2004). Protein folding failure sets high-temperature limit on growth of phage P22 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Applied and environmental microbiology, 70(8), 4840-4847.
- Quiroz-Guzmán Eduardo, Peña-Rodríguez Alberto, Vázquez-Juárez Ricardo, Barajas-Sandoval Diana R., Balcázar José L. & Martínez-Días Sergio F. (2018). Bacteriophage cocktails as an environmentally-friendly approach to prevent *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* infections in brine shrimp (*Artemia franciscana*) production. Aquaculture. 492. (1), 273-279.
- Quiróz-Guzman, E. (2013). Control de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* durante la producción de nauplios de *Artemia franciscana* mediante un consorcio de bacterias probióticas y fagos. Tesis de doctorado. CICIMAR-IPN. México. 198 p.
- Rakhuba, D.V., E.I. Kolomiets, D.E Szwajcjer & G.I. Novik. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. Polish J Microbiol. 59: 145–155.
- Raya, R.R. & E.M. Hébert. (2009). Isolation of phage via induction of lysogens, p 23–32. En: Clokie MRJ, Kropinski AM (ed), Bacteriophages: methods and protocols, vol 1. Isolation, characterization, and interactions. Reino Unido. 313 p.
- Roberfroid, M., G.R. Gibson, L. Hoyles, A.L. McCartney, R. Rastall, I. Rowland, D. Wolvers, B. Watzl, H. Szajewska, B. Stahl, F. Guarner, F. Respondek, K. Whelan, V. Coxam, MJ. Davicco, L. Léotoing, Y. Wittrant, N. Delzenne, P.D. Cani, A.M. Neyrinck, & A. Meheust. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. British Journal of Nutrition, 104(S2), S1--S63.
- Roossinck, M.J. 2015. Move over bacteria! Viruses make their mark as mutualistic microbial symbionts. J Virol., 89:6532–6535
- Rørbo, N., Rønneseth, A., Kalatzis, P. G., Rasmussen, B. B., Engell-Sørensen, K., Kleppen, H. P., & Middelboe, M. (2018). Exploring the effect of phage therapy in preventing *Vibrio anguillarum* infections in cod and turbot larvae. Antibiotics, 7(2), 42.
- Salazar-Llanos, C. V., (2018). Aislamiento y determinación del rango de hospedero de bacteriófagos de *Salmonella* spp. Memoria Profesional. Universidad de Chile, Santiago, Chile: 1-26 p.

- Seemann T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30(14), 2068–2069.
- Sheth, R.U., V. Cabral, S.P. Chen, & H.H. Wang. 2016. Manipulating bacterial communities by in situ microbiome engineering. *Trends in Genetics*, 32(4), 189-200.
- Silva, Y. J., Costa, L., Pereira, C., Cunha, Â., Calado, R., Gomes, N. C., & Almeida, A. (2014b). Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture. *Microbial biotechnology*, 7(5), 401-413.
- Silva, Y.J., L. Costa, C. Pereira, C. Mateus, A. Cunha, R. Calado, N.C. Gomes, M.A. Pardo, I. Hernandez & A. Almeida. (2014a). Phage therapy as an approach to prevent *Vibrio anguillarum* infections in fish larvae production. *PLoS ONE*, 9 (12): e114197.
- Slawomir Michniewski, Branko Rihtman, Ryan Cook, Michael A. Jones, William H. Wilson, David J. Scanlan & Andrew Millard. (2021) A new family of “megaphages” abundant in the marine environment. *ISME COMMUN.* 1, 58
- Stalin, N. & P. Srinivasan. 2016. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phage from shrimp pond in Palk Strait, South East coast of India. *Biologicals*, 44(6), 526-533.
- Stoddard, L.I., J.B. Martiny & M.F. Marston. (2007). Selection and characterization of cyanophage resistance in marine *Synechococcus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(17): 5516-5522.
- Suttle, C.A. 2005. Viruses in the sea. *Nature*, 437(7057): 356-361.
- Sullivan MB, Coleman ML, Quinlivan V, Rosenkrantz JE, Defrancesco AS, Tan G, Fu R, Lee JA, Waterbury JB, Bielawski JP, Chisholm SW. (2008). Portal protein diversity and phage ecology. *Environ Microbiol.* 10(10):2810-23.
- Suttle, C. A. (2005). Viruses in the sea. *Nature* 437, 356–361
- Suttle, C.A. (2007). Marine viruses — major players in the global ecosystem. *Nature Rev.*
- Tuajuanda C. Jordan, Sandra H. Burnett, Susan Carson, Steven M. Caruso, Kari Clase, Randall J. DeJong, John J. Dennehy, , Dee R. Denver, David Dunbar, Sarah C. R. Elgin, Ann M. Findley, Chris R. Gissendanner, Urszula P. Golebiewska, Nancy Guild, Grant A. Hartzog, Wendy H. Grillo, Gail P. Hollowell, Lee E. Hughes, Allison Johnson, Rodney A. King, Lynn O. Lewis, Wei Li, Frank Rosenzweig, Michael R. Rubin, Margaret S. Saha, James Sandoz, Christopher D. Shaffer, Barbara Taylor, Louise Temple, Edwin Vazquez, Vassie C. Ware, Lucia P. Barker, Kevin W. Bradley, Deborah Jacobs-Sera, Welkin H. Pope, Daniel A. Russell, Steven G. Cresawn, David Lopatto, Cheryl P. Bailey & Graham F. (2014). A Broadly Implementable Research Course in Phage Discovery and Genomics for First-Year Undergraduate Students. *mBio* 5(1):e01051-13.
- Tynecki Piotr, Arkadiusz Guziński, Joanna Kazimierczak, Michał Jadczyk, Jarosław Dastyk & Agnieszka Onisko. (2020). PhageAI - Bacteriophage Life Cycle Recognition with Machine Learning and Natural Language Processing. *bioRxiv*.
- Veyrand-Quirós B. Gómez-Gil B., Lomeli-Ortega C.O., Escobedo-Fregoso C., Millard A.D., Tovar-Ramírez D., Balcázar J.L., & Quiroz-Guzmán E. (2020). Use of bacteriophage vB_Pd_PDCC-1 as biological control agent of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* during hatching of longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) eggs. *J Appl Microbiol* 129:1497–1510.

- Vorobey, E.S., O.S. Voronkova & A.I. Vinnikov. (2017). Correction of vaginal dysbiosis in mice caused by a film-forming strain *Staphylococcus aureus*, using bacteriophages and probiotics. *Regul. Mech. Biosyst.* 8(2), 252-258.
- Walakira, J. K., (2008). Discovery, isolation and characterization of bacteriophages specific for *Edwardsiella ictaluri*. Tesis de Maestría. Auburn University, Alabama, USA 80 p.
- Wang, Y., M. Barton, L. Elliott, X. Li, S. Abraham, M. O'Dea, & J. Munro, J. (2017). Bacteriophage therapy for the control of *Vibrio harveyi* in greenlip abalone (*Haliotis laevis*). *Aquaculture* 473, 251-258.
- Wang, Y.B., J.R. Li & J. Lin. (2008). Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*, 281: 1-4.
- Weinbauer, M.G. & P. Peduzzi. (1995). Effect of virus-rich high molecular weight concentrates of seawater on the dynamics of dissolved amino acids and carbohydrates. *Marine ecology progress series*. Oldendorf, 127(1): 245-253.
- Wichels A, Biel SS, Gelderblom HR, Brinkhoff T, Muyzer G & Schutt CH (1998) Bacteriophage diversity in the North Sea. *Appl Environ Microbiol* 64:4128–4133
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS computational biology*, 13(6), e1005595.
- Wittebole, X., S. De Roock & S.M. Opal. 2014. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens, *Virulence*, 5:1, 226--235.
- Wittebole, X., S. De Roock & S.M. Opal. 2014. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens, *Virulence*, 5:1, 226--235.
- Woo, J. & J. Ahn. (2014). Assessment of synergistic combination potential of probiotic and bacteriophage against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to simulated intestinal conditions. *Arch Microbiol.* 196(10), 719-727.
- Wu Liting, Yuan Tian, Pang Maoda, Yang Zhenquan, Bao Hongduo, Shou Yan, Sun Lichang, Wang Ran & Zhang Hui. (2021). A novel vibriophage vB_VhaS_PcB-1G capable of inhibiting virulent *Vibrio harveyi* pathogen. *Aquaculture* 542, 736854.
- Yanhui Wang, Mary Barton, Lisa Elliott, Xiaoxu Li, Sam Abraham, Mark O' Dea, & James Munro. (2017). Bacteriophage therapy for the control of *Vibrio harveyi* in greenlip abalone (*Haliotis laevis*). 473 (20), 251-258.
- Yolanda J. Silva, Catarina Moreirinha, Carla Pereira, Liliana Costa, Rui J. M. Rocha, Ángela Cunha, Newton C. M. Gomes, Ricardo Calado, & Adelaide Almeida. (2016). Biological control of *Aeromonas salmonicida* infection in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with Phage AS-A. *Aquaculture*. 450 (1) 225-233.
- Zerbino D. R. (2010). Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. *Current protocols in bioinformatics*, Chapter 11, Unit–11.5.
- Zhang, J., Z. Cao, Z. Li, L. Wang, H. Li, F. Wu, L. Jin, X. Li, S. Li & Y. Xu. (2015). Effect of bacteriophages on *Vibrio alginolyticus* infection in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Journal of the World Aquaculture Society*, 46(2), 149-158.

Zhen Li, Hongyu Ren, Qiang Li, Bilal Murtaz, Xiaoyu Li, Jiancheng Zhang, & Yongping Xu. (2020). Exploring the effects of phage cocktails in preventing *Vibrio* infections in juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) farming. *Aquaculture*. 515, 734599.

Effects of Nutritional Status and Environmental Factors on The Endocrine Regulation of Feeding in Freshwater Fish

Helene Volkoff

Department of Biology, Memorial University of Newfoundland,
St John's, NL, Canada, E-mail: hvolkoff@mun.ca

In fish, food intake is ultimately regulated by feeding centers of the brain, which receive and process information from endocrine signals from both brain and peripheral tissues such as the gastrointestinal tract. These endocrine signals induce [orexigenic, such as orexin, neuropeptide Y (NPY) and ghrelin] or inhibit [anorexigenic, such as cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), leptin, peptide Y (PYY), cholecystokinin (CCK), proopiomelanocortin (POMC)] food intake, and maintain energy homeostasis (1, 2). Levels of energy stores, feeding status (e.g. fasting) and diet composition, as well as environmental conditions (e.g. temperature, pH, oxygen levels) influence feeding and the expression of endocrine appetite regulators.

Food quantity and quality affects feeding

Fasting induces "hunger" in fish and usually increases the expression of orexigenic hormones and decreases that of anorexigenic hormones (1, 3). However, the effects of fasting on appetite regulating hormones appear to depend on the species examined and its feeding habits, the duration of the fasting period and the tissue examined (1). For example, in Characiformes, fasting increases orexin brain expression in all species examined to date, but decreases CART brain expression in the Serrasalminidae family but not the Characidae family, and decreases gut CCK in herbivore species but not carnivores (4). In platyfish, *Xiphophorus maculatus*, fasting decreases CCK expression in both brain and intestine (5), similar to goldfish *Carassius auratus* (6) and grass carp *Hypophthalmichthys molitrix* (7) whereas in pacu *Piaractus mesopotamicus*, fasting decreases CCK in gut but not in brain (8) and in dourado *Salminus brasiliensis*, fasting has no effect on CCK in either brain or gut (9). Appetite regulators are also affected by the act of feeding and many display periprandial changes in expression, higher expression levels of orexigenic factors and anorexigenic signals occurring before and after mealtime, respectively (1, 3).

Diet composition affects food intake and the expression of appetite-regulating hormones in fish. For example, high fat diets affect brain NPY expression in goldfish (10) and NPY, CART and POMC expressions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (11). However, these changes are species-specific and depend in particular on the feeding habits. For example, in pacu, a herbivorous species, food intake and expressions of orexin, CART, CCK and leptin are not affected by replacement of fish protein with soy protein, suggesting that pacu is able to tolerate a diet rich in plant material (8). However, in dourado, a carnivorous species, food intake and the expressions of the anorexigenic hormones CCK and PYY in the intestine and in pyloric caeca decrease with increasing dietary plant protein contents (Sabioni and Volkoff, unpublished).

Environmental factors affect feeding

The influence of temperature on feeding varies depends on species and its habitat. In general, food intake increases with moderate temperature increases, and decreases when temperatures are outside the fish optimal temperature range (12, 13). In goldfish, higher temperatures increase feeding along with increases in the expressions of orexigenic hormones (brain orexin) and decreases of that of anorexigenic hormones (brain CART, and intestine YY and CCK) (14). In Atlantic salmon *Salmo salar*, temperature-induced variations in feeding have been correlated to changes in plasma concentrations of ghrelin (15) and leptin (16).

Low pH, often due to increases in CO₂, usually decreases food intake in fish, as seen in goldfish (14), fathead minnows *Pimephales promelas* (17) and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (18). In goldfish, this decrease in feeding is mediated by increases in the expressions of anorexigenic peptides [CART1 and CART2 in the hypothalamus and CCK and PYY in the intestine] (14). However, species-specific differences in response have been shown. For example, high CO₂ levels do not alter the behavior of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (19), which might be due in part to an adaptation to low environmental oxygen conditions seen in the habitat of this species (20).

Low oxygen levels (hypoxia) usually decreases feeding (21), and this response is concomitant with changes in the expression of appetite regulators. For example, hypoxia increases hepatic leptin expression in common carp *Cyprinus carpio* (22) and zebrafish *Danio rerio* (23) and decreases in hypothalamic leptin in carp (22).

Other environmental factors such as light, turbulence, salinity, stock densities and pollutants have also been shown to affect feeding and appetite regulators [see (12, 24, 25) for review].

Acknowledgements: Support by a Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) Discovery grant (# 261414-03).

References

1. Volkoff, H. (2019) Fish as models for understanding the vertebrate endocrine regulation of feeding and weight. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 497, 110437.
2. Ronnestad, I., A.S. Gomes, K. Murashita, R. Angotzi, E. Jonsson, and H. Volkoff (2017) Appetite-controlling endocrine systems in teleosts. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 73.
3. Bertucci, J.I., A.M. Blanco, L. Sundarrajan, J.J. Rajeswari, C. Velasco, and S. Unniappan (2019) Nutrient regulation of endocrine factors influencing feeding and growth in fish. *Frontiers in Endocrinology*, 10.
4. Butt, Z.D., E. O'Brien, and H. Volkoff (2019) Effects of fasting on the gene expression of appetite regulators in three Characiformes with different feeding habits (*Gymnocorymbus ternetzi*, *Metynnis argenteus* and *Exodon paradoxus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 227, 105-115.
5. Pitts, P.M. and H. Volkoff (2017) Characterization of appetite-regulating factors in platyfish, *Xiphophorus maculatus* (Cyprinodontiformes Poeciliidae). *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 208, 80-88.
6. Peyon, P., H. Saied, X. Lin, and R.E. Peter (1999) Postprandial, seasonal and sexual variations in cholecystokinin gene expression in goldfish brain. *Molecular Brain Research*, 74(1), 190-196.
7. Feng, K., G.-r. Zhang, K.-j. Wei, B.-x. Xiong, T. Liang, and H.-c. Ping (2012) Molecular characterization of cholecystokinin in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): cloning, localization, developmental profile, and effect of fasting and refeeding on expression in the brain and intestine. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(6), 1825-1834.
8. Volkoff, H., R. Estevan Sabioni, L.L. Coutinho, and J.E.P. Cyrino (2017) Appetite regulating factors in pacu (*Piaractus mesopotamicus*): Tissue distribution and effects of food quantity and quality on gene expression. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 203, 241-254.
9. Volkoff, H., R.E. Sabioni, and J.E.P. Cyrino (2016) Appetite regulating factors in dourado, *Salminus brasiliensis*: cDNA cloning and effects of fasting and feeding on gene expression. *General and Comparative Endocrinology*, 237, 34-42.
10. Narnaware, Y.K. and R.E. Peter (2002) Influence of diet composition on food intake and neuropeptide Y (NPY) gene expression in goldfish brain. *Regulatory Peptides*, 103(2), 75-83.
11. Librán-Pérez, M., I. Geurden, K. Dias, G. Corraze, S. Panserat, and J.L. Soengas (2015) Feeding rainbow trout with a lipid-enriched diet: effects on fatty acid sensing, regulation of food intake and cellular signaling pathways. *Journal of Experimental Biology*, 218(16), 2610-2619.
12. Volkoff, H., *Feeding and its regulation*, in *Climate Change and Non-infectious Fish Disorders*, P.T.K. Woo and G.K. Iwama, Editors. 2020, CABI (Centre for Agriculture and Biosciences International): Oxfordshire, United Kingdom.
13. Volkoff, H. and I. Rønnestad (2020) Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish. *Temperature*, 7(4), 307-320.
14. Nadermann, N., R.K. Seward, and H. Volkoff (2019) Effects of potential climate change -induced environmental modifications on food intake and the expression of appetite regulators in goldfish. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 235, 138-147.

15. Vikeså, V., L. Nankervis, and E.M. Hevrøy (2017) Appetite, metabolism and growth regulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) exposed to hypoxia at elevated seawater temperature. *Aquaculture Research*, 48(8), 4086–4101.
16. Kullgren, A., F. Jutfelt, R. Fontanillas, K. Sundell, L. Samuelsson, K. Wiklander, P. Kling, W. Koppe, D.G.J. Larsson, B.T. Björnsson, and E. Jonsson (2013) The impact of temperature on the metabolome and endocrine metabolic signals in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 164(1), 44-53.
17. Lemly, A.D. and R.J.F. Smith (1987) Effects of chronic exposure to acidified water on chemoreception of feeding stimuli in fathead minnows (*Pimephales promelas*): Mechanisms and ecological implications. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6(3), 225-238.
18. Mustapha, M.K. and S.D. Atolagbe (2018) Tolerance level of different life stages of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) to low pH and acidified waters. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 79(1), 46.
19. Tix, J.A., C.T. Hasler, C. Sullivan, J.D. Jeffrey, and C.D. Suski (2017) Elevated carbon dioxide has the potential to impact alarm cue responses in some freshwater fishes. *Aquatic Ecology*, 51(1), 59-72.
20. Heuer, R.M. and M. Grosell (2014) Physiological impacts of elevated carbon dioxide and ocean acidification on fish. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307(9), R1061.
21. Abdel-Tawwab, M., M.N. Monier, S.H. Hoseinifar, and C. Faggio (2019) Fish response to hypoxia stress: growth, physiological, and immunological biomarkers. *Fish Physiology and Biochemistry*, 45(3), 997-1013.
22. Bernier, N.J., M. Gorissen, and G. Flik (2012) Differential effects of chronic hypoxia and feed restriction on the expression of leptin and its receptor, food intake regulation and the endocrine stress response in common carp. *Journal of Experimental Biology*, 215(13), 2273-2282.
23. Chu, D.L.H., V.W.T. Li, and R.M.K. Yu (2010) Leptin: Clue to poor appetite in oxygen-starved fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 319(1), 143-146.
24. Kestemont, P. and E. Baras (2001) Environmental Factors and Feed Intake: Mechanisms and Interactions. *Food Intake in Fish*, 131-156.
25. Conde-Sieira, M., M. Chivite, J.M. Míguez, and J.L. Soengas (2018) Stress effects on the mechanisms regulating appetite in teleost fish. *Frontiers in Endocrinology*, 9.

El Titarro (*Lathyrus cicera* L.) como una Alternativa Sustentable para el Reemplazo De Harina de Soya en Alimentos de *Oncorhynchus mykiss*

Toledo-Solís F.J.^{1,2*}, Yagüe S.³, Mateos-Aparicio I.⁴, Pérez V.⁵, Larrán A.M.³,
Moyano F.J.⁶, Fernández I.⁷

¹Centro de Investigaciones Costeras, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Calle Juan José Calzada s/n, 30500 Tonalá, Chiapas, México.

²Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Av. Insurgentes Sur 1582, Alcaldía Benito Juárez, 03940 Ciudad de México, México.

³Centro de Investigación en Acuicultura, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Ctra. Arévalo, 40196 Zamarramala, Segovia, España.

⁴Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, España.

⁵Universidad de León, Campus Vegazana s/n, E-24071 León, España.

⁶Departamento de Biología y Geología, Universidad de Almería, 04120 Almería, España.

⁷Centro Oceanográfico de Vigo, Instituto Español de Oceanografía, Subida Radio Faro 50, 36390 Vigo, Pontevedra, España *Email: fj.toledos@gmail.com

Resumen

La sustentabilidad de la acuicultura se basa en la identificación e incorporación de nuevas materias primas alternativas (MPAs) para reemplazar la harina y/o aceite de pescado. Actualmente, se consideran distintas MPAs como la harina de soya, insectos o algas, entre otras. Sin embargo, la harina de soya es una de las harinas alternativas más ampliamente utilizada en la sustitución de la harina de pescado, importándose de países como EU, Argentina, Brasil, entre otros. Esto ocasiona una dependencia de las producciones de terceros países, el aumento de la huella de carbono, y un mayor costo de manufactura de los alimentos. Por lo tanto, es urgente la identificación de MPAs producidas localmente para sustituir la harina de soya. La harina de titarro (*Lathyrus cicera*) es una MPAs de producción local en España, y que ha sido seleccionada y caracterizada mediante un proceso que integró herramientas multiparamétricas. Y en este estudio, mediante una aproximación dosis-respuesta *in vivo*, se evaluó la sustitución de la harina de soya por la harina de titarro en dietas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). El experimento se realizó en un sistema de recirculación con parámetros controlados (temperatura 15°C, oxígeno disuelto de > 7 mg/L, etc.). Se utilizaron un total de 360 juveniles (de 10 ± 0.5 g) que fueron alimentados diariamente al 3% de su biomasa durante un periodo de 90 días con dietas donde el 0, 8, 16, 33, 66 y 100% de la harina de soya fue sustituido por harina de titarro (nombradas como Control, T8, T16, T33, T66 y T100, respectivamente). Al finalizar el ensayo se evaluó el crecimiento de los juveniles y los niveles postprandiales de glucosa y triglicéridos en plasma. Los resultados de crecimiento mostraron valores significativamente menores en todos los parámetros de crecimiento (peso húmedo, ganancia en peso, tasa de crecimiento instantáneo, factor de conversión, entre otros) solo cuando los peces fueron alimentados con la dieta T100

(ANOVA, $p>0.05$). Estos efectos pudieron estar inducidos por la presencia de factores anti-nutricionales (FANs) y/o polisacáridos no amiláceos (PNAs) en la harina de titarro. La caracterización de PNAs, indicó que la fracción total está representada mayormente por los monosacáridos de glucosa y arabinosa. En este sentido, en los resultados del análisis postprandial en plasma se observó un efecto de hipoglucemia en las dietas con mayor porcentaje de sustitución de la harina de soya (T66 y T100), sugiriéndose que los PNAs del titarro podrían limitar la digestión y/o absorción de otros carbohidratos. También, en el contenido de triglicéridos se observó una disminución en los niveles postprandiales a las 3 y 6 horas después de la alimentación en los peces alimentados con una dieta con sustitución mayor del 8%. A falta de resultados complementarios a nivel histológico y del valor nutricional del filete, los resultados sugieren que la sustitución de la harina de soya por harina de titarro es posible hasta el 66% en dietas para juveniles de trucha arcoíris sin efectos a nivel de crecimiento.

Palabras clave: *leguminosas, factores anti-nutricionales, polisacáridos no amiláceos, harinas vegetales, bioquímica sanguínea postprandial.*

Introducción

Una parte de la sustentabilidad de la acuicultura se basa en la identificación e incorporación de nuevas materias primas alternativas (MPAs), para remplazar la harina y/o aceite de pescado en las dietas de peces. A pesar de la aparición de nuevas MPAs, las harinas y/o subproductos vegetales siguen siendo las principales MPAs implementadas en la industria acuícola (Gatlin *et al.*, 2007; Kokou and Fountoulaki, 2018). Entre sus beneficios destacan los aportes nutricionales, producción en volumen y la accesibilidad en costos con respecto a otras harinas provenientes de algas (macro y/o micro) e insectos, entre otras. A la mayoría de las harinas de origen vegetal se les cuestiona por tener algunos efectos negativos (ej. Reducción del crecimiento y daños al sistema digestivo, entre otros) por el contenido en factores anti-nutricionales (FANs) (Król *et al.*, 2016; Hemre *et al.*, 2018). Sin embargo, muchos de los FANs pueden ser eliminados y/o su actividad reducida con la ayuda de tratamientos y/o procesos como la cocción o la fermentación, entre otros (Francis *et al.*, 2001; Dawood and Koshio, 2019).

En las dietas para peces, la soja se posiciona como una de las harinas vegetales alternativas más utilizadas para la sustitución de la harina de pescado (Nie and Hallerman, 2021) al disponer de un alto contenido en proteína y un perfil de aminoácidos bastante adecuado para los organismos acuáticos (Peres *et al.*, 2003). Esta leguminosa, es importada en volúmenes considerables de países productores como Estados Unidos, Brasil y Argentina, entre otros (De Visser *et al.*, 2014). Por lo tanto, es urgente la identificación de nuevas MPAs producidas localmente con la finalidad de sustituir la harina de soja en los alimentos acuícolas. Esto ayudaría a evitar la dependencia de las producciones de terceros países, al mismo tiempo que se podrían reducir los costos de manufactura y la huella de carbono en los alimentos ocasionada por la logística de esas importaciones.

En Europa y países como España, el sector acuícola desarrolla investigaciones enfocadas en la búsqueda de nuevas MPAs que puedan ser incorporadas en los piensos, con especial interés en especies de importancia comercial como es la trucha arcoíris (Tomás-Almenar *et al.*, 2020). En la comunidad de Castilla y León, existen algunos cultivos locales que podrían ser MPAs para los piensos de esta especie. Por ello, en estudios previos realizados en esta comunidad, nueve semillas de leguminosas fueron seleccionadas, y sus propiedades nutricionales caracterizadas en laboratorio mediante diferentes análisis paramétricos. Entre estas, destacaron las propiedades de la harina de alverjón (*Vicia narbonensis*) y del titarro (*Lathyrus cicera*). Si bien ya se dispone de ciertos datos

sobre ensayos realizados con la primera en dietas de trucha arcoíris (Toledo-Solís *et al.*, 2022 *en revisión*), no ocurre así en el caso del titarro.

El cultivo del titarro se caracteriza por su alta adaptabilidad a diversos ambientes, llegándose a desarrollar en suelos pobres y de bajas precipitaciones, encontrándose cultivos situados en regiones del Mediterráneo, partes de la India y Norte de África (Hammer *et al.*, 2018). El titarro, como otras especies del género *Lathyrus*, ha formado parte de la alimentación humana y de los animales domésticos desde hace décadas (Ramachandra *et al.*, 2005). El consumo en humanos se abandonó porque se asoció al desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa, conocida comúnmente como latirismo, que se manifiesta como una parálisis en las extremidades inferiores, y que es debida a la presencia en las semillas del aminoácido no proteico β -N-oxalil-L- α ,-ácido diaminopropiónico (β -ODAP). (Sacristán *et al.*, 2015). En animales domésticos, la evaluación de los efectos de β -ODAP se ha centrado principalmente en cerdos, ovejas y aves de corral, encontrándose resultados contradictorios. Parte de los estudios encontraron efectos ligeros debido a un alto consumo de esta semilla durante un tiempo prolongado, mientras que otros estudios dichos efectos no se han observado (Hanbury *et al.*, 2000, Hanbury and Hughes, 2003; White *et al.*, 2002; Mullan *et al.*, 2009). Actualmente, se están retomando y promoviendo los cultivos del género *Lathyrus* para la alimentación en animales y como un recurso para establecer cultivos intercalados (policultivos), en los cuales se pueden conseguir mejores rendimientos ante los monocultivos establecidos (Vlachostergios *et al.*, 2018; Hammer *et al.*, 2018).

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la sustitución de la harina de soya por harina de titarro en juveniles de trucha arcoíris por medio de un estudio dosis-respuesta *in vivo*.

Materiales y Métodos

Autorización ética

El experimento cumplió con las directrices de experimentación animal de acuerdo al Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments (ARRIVE) de Percie du Sert *et al.* (2020) y el acuerdo 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, la directriz 86/609/UE del Consejo de la Unión Europea y la legislación Española (RD53/2013), para garantizar una experimentación animal ética y el bienestar de los peces. Por otra parte, el personal involucrado en el experimento está capacitado para el manejo de animales de experimentación según la Orden ECC/566/2015 de la legislación Española. Todos los procedimientos fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética del ITACyL (número de aprobación: 31/2018/CEEA).

Obtención de la harina de titarro

En la Comunidad de Castilla y León (España) fueron seleccionadas como potenciales candidatas para ser incorporadas en alimentos acuícolas nueve semillas de origen local, por su pertinencia nutricional, económica y ambiental. Dichas semillas se caracterizaron por diferentes análisis en relación a su contenido nutricional, biodisponibilidad de nutrientes y presencia de FANs, entre otros parámetros. Como resultado se encontró que la harina de titarro podría ser una candidata adecuada para continuar con una evaluación *in vivo* como alternativa a la harina de soya en alimentos para juveniles de trucha arcoíris (Toledo-Solís *et al.*, 2022 *en revisión*). Para la utilización de la semilla en las distintas pruebas, se molió hasta obtener una harina de tamaño de partícula menor a 500 μm .

Caracterización de polisacáridos no amiláceos (PNAs)

La determinación total de la fibra dietética (soluble e insoluble) se llevó a cabo según el método enzimático-gravimétrico de la AOAC 991.43. Los residuos gravimétricos se trataron con H_2SO_4 12 M a 35 °C durante 30 minutos, seguido de H_2SO_4 2 M a 100 °C durante 1 hora. Los azúcares neutros liberados de los polisacáridos no amiláceos (PNAs) se transformaron en acetatos de alditol con anhídrido acético en presencia de 1-metilimidazol y se cuantificaron por cromatografía de gases (GLC), utilizando como patrón interno β -D-alosa (Fluka), en un sistema de cromatografía Perkin-Elmer (Waltham, EE. UU.), equipado con un detector de ionización con llama de hidrógeno. La columna utilizada fue una SP-2330 (30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película) y como gas portador se utilizó nitrógeno. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 275 °C y la temperatura del horno de 235 °C. El contenido de ácido urónico se

determinó según el método colorimétrico del 3,5-dimetilfenol previamente adaptado a un lector de microplacas (Synergy™ HTX Multi-Mode, BioTek, Winooski, VT, EE. UU.), utilizándose como patrón estándar ácido galacturónico monohidrato (Merck). El cálculo total de PNAs se realizó mediante la suma de azúcares neutros y ácidos, expresándose en mg/g de materia prima seca.

Diseño experimental y condiciones de cultivo

Se realizó un experimento dosis-respuesta durante 90 días. Las dietas presentaron diferentes porcentajes de sustitución de la harina de soya por harina de titarro: 0, 8, 16, 33, 66 y 100% (nombradas como Control, T8, T16, T33, T66 y T100, respectivamente). Se utilizaron un total de 360 juveniles de trucha arcoíris con un peso húmedo medio de 10.4 ± 0.1 g y de una longitud furcal inicial (LFI) de 9.5 ± 0.1 cm. La distribución se hizo aleatoriamente (20 individuos/tanque y 3 tanques por dieta) en 18 tanques de 500 L conectados a un sistema de recirculación. El bioensayo se realizó bajo parámetros controlados de temperatura (15 °C), oxígeno disuelto (>7 mg/L) y un fotoperiodo de luz:oscuridad de 12:12 horas. Las concentraciones de amonio y nitratos se monitorearon todos los días para mantenerlos por debajo de los valores tóxicos. La alimentación se realizó diariamente por las mañanas (entre las 08:00-09:00 horas) a saciedad aparente, utilizándose como máximo el 3% de la biomasa.

Formulación y elaboración de alimentos

En la Tabla 1 se muestra la formulación de las seis dietas experimentales. Los piensos se prepararon por extrusión en diferentes diámetros (2, 3.5 y 5 mm) de acuerdo con el tamaño de las truchas a lo largo del ensayo. La fabricación de los alimentos se realizó en la Unidad de Piensos Experimentales de la Universidad de Almería (Almería, España).

Tabla 1. Formulación, composición proximal y digestibilidad aparente de las dietas experimentales.

Ingredientes (g/100 g)	Dietas					
	Control	T8	T16	T33	T66	T100
Harina de pescado						
LT	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Harina de titarro	0.00	2.50	5.00	10.00	20.00	30.00
Harina de soya	30.00	27.50	25.00	20.00	10.00	0.00
Gluten de trigo	12.02	13.02	14.01	16.01	19.99	23.98
Harina de trigo	13.46	12.37	11.27	9.27	5.13	0.99
Aceite de pescado	6.75	6.75	6.75	6.75	6.75	6.75
Aceite vegetal	6.75	6.75	6.75	6.75	6.75	6.75
Lecitina de soya	1.45	1.43	1.40	1.35	1.25	1.14
Premix ^a	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Aglutinante ^b	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Metionina	0.52	0.54	0.54	0.56	0.56	0.56
Lisina	0.05	0.12	0.18	0.31	0.57	0.83
Total	100	100	100	100	100	100
Composición proximal (% de materia seca)						
Humedad	5.56 ± 0.33 ^a	3.98 ± 0.15 ^d	4.10 ± 0.25 ^{cd}	4.79 ± 0.35 ^{bc}	4.93 ± 0.30 ^{ab}	5.27 ± 0.11 ^{ab}
Proteína	42.67 ± 0.92	42.34 ± 0.38	42.34 ± 0.47	42.61 ± 1.60	42.43 ± 1.26	42.78 ± 0.63
Lípidos	20.82 ± 0.18 ^b	22.01 ± 0.33 ^a	21.06 ± 0.71 ^{ab}	20.86 ± 0.20 ^b	20.85 ± 0.16 ^b	20.21 ± 0.31 ^b
Fibra	1.91 ± 0.16	1.81 ± 0.20	1.69 ± 0.15	1.98 ± 0.14	1.91 ± 0.00	1.91 ± 0.18
Cenizas	8.17 ± 0.05	7.63 ± 0.25	8.46 ± 0.17	7.30 ± 1.05	7.12 ± 0.29	8.37 ± 0.25

^aVitamina y minerales premix TECNOVIT; ^bGuar gum; En las filas, las letras en el superíndice de los números indican diferencias entre dietas experimentales (ANOVA; prueba de tukey; $p < 0.05$; $n=3$).

Digestibilidad aparente

La digestibilidad aparente de la proteína se determinó utilizando el método de cenizas insolubles en ácido de Guelph modificado (Cho *et al.*, 1982), y el cálculo se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{CDAProteína (Coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína)} = 100 - [(\text{marcador en dieta/marcador en heces}) \times (\% \text{ proteína en heces} / \% \text{ proteína en dieta}) \times 100]$$

Análisis proximal y perfil de aminoácidos

Se analizó la composición proximal en la harina y en las dietas experimentales. Los parámetros analizados se expresaron en porcentaje con relación a la materia seca. La determinación del

contenido de humedad, proteína y nitrógeno se realizó de acuerdo con los procedimientos oficiales de la AOAC (AOAC, 1990) y el Diario Oficial de la Unión Europea (OJEU, 2009). La humedad se calculó secando las muestras a 105 °C durante 24 horas hasta obtener un peso constante. El contenido en nitrógeno se analizó por el método Kjeldahl ($N \times 6.25$), los lípidos por extracción con diclorometano (Soxhlet) y el contenido de cenizas por calentamiento del residuo obtenido de la determinación de humedad en una mufla a 550 °C durante 24 horas. El contenido de fibra bruta, se calculó en las fracciones desengrasadas después de la digestión con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio, y calentándose a 550 °C durante 3 horas. El cálculo del extracto libre de nitrógeno se realizó según Brett y Groves, (1979).

Para el análisis del perfil de aminoácidos en la harina de titarro y dietas experimentales se utilizaron 20 mg de muestras y todas las pruebas se realizaron por triplicado. Primeramente, se efectuó una hidrólisis con 1 ml de HCl 6 N durante 24 horas a 110 °C, posteriormente las muestras se neutralizaron con NaOH 6.5 N y se diluyeron diez veces con tampón de carga pH 2.2 (80-2037-67, Biochrom, Cambridge, Reino Unido). La determinación se realizó mediante cromatografía líquida de intercambio iónico y de reacción continua post-columna con ninhidrina (Biochrom 30+, Cambridge, Reino Unido) para proporcionar un análisis de composición cualitativa y cuantitativa, utilizándose como patrón interno la norleucina.

Índices de crecimiento y eficiencia alimenticia

Durante el experimento se monitoreó el crecimiento de los peces cada 21 días, en términos de peso húmedo y longitud furcal, con el fin de ajustar la ración diaria de alimento. Para ello, los peces fueron anestesiados levemente con MS-222 (180 mg/mL), midiéndose la longitud furcal con un ictiómetro graduado (0.1 mm) y el peso húmedo con una balanza GRAM S3R-6KD (0.1 g). Todos los días se registró el consumo de alimento en cada tanque y la mortalidad. Para el análisis de digestibilidad aparente las heces se recogieron durante las últimas dos semanas del ensayo. Las heces de cada unidad experimental se almacenaron a -80 °C hasta su respectivo análisis. Al finalizar el experimento, se calcularon los siguientes índices de crecimiento de acuerdo a lo descrito en Tomás-Almenar *et al.* (2020).

Toma de muestras

Al finalizar el ensayo se tomaron muestras de sangre para el análisis bioquímico en plasma de tres peces de forma aleatoria. Los peces se muestrearon al momento de finalizar la alimentación (0 horas), a las 3 y 6 horas después de alimentar, utilizándose un total de 9 peces por tratamiento. La sangre se tomó de la vena caudal utilizando jeringas plásticas de 1 mL recubiertas con heparina de litio como anticoagulante, y se transfirieron a tubos de 1 mL con heparina de litio (MiniCollect®). El plasma se obtuvo por centrifugación a 5000 rpm durante 20 min a 4 °C y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

Análisis postprandial

La determinación de glucosa y triglicéridos en plasma se realizó con kits de ensayo colorimétricos de glucosa-TR (BSIS17_E) y triglicéridos (BSIS31_E) según las instrucciones del fabricante (Spinreact®). La absorbancia se midió en microplacas de 96 pocillos utilizando un lector de microplacas (ELx800TM; BioTek Instruments, Inc., Vermont-EE.UU.).

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como valores medios \pm desviaciones estándar. Todos los datos se verificaron previamente en cuanto a normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad de la varianza (prueba de Bartlett). La comparación de los resultados se realizó mediante un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. El nivel de significación en ambos se fijó en $p < 0.05$, y todos los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.).

Resultados y discusión

Características nutricionales del titarro

El contenido nutricional del titarro se ha discutido y/o analizado en estudios previos. Las primeras investigaciones se centraron en la composición química proximal, describiendo un contenido de proteína que oscila entre 22-31%, algo menos del 5% de lípidos y un alto contenido de carbohidratos (40-60%), dependiendo de la variedad, región y/o estacionalidad del cultivo (Hanbury *et al.*, 2000; White *et al.*, 2002). En el presente estudio los resultados de la composición proximal y perfil de aminoácidos (Tabla 2), son similares a lo descrito en la literatura para varias leguminosas (Martín-Pedrosa *et al.*, 2016).

Tabla 2. Análisis de composición proximal y perfil de aminoácidos de la harina de titarro (*Lathyrus cicera*).

Composición proximal (% de materia seca)	
Proteína	23.82 ± 0.47
Lípido	2.03 ± 0.06
Carbohidratos (ELN)	70.37 ± 0.39
Cenizas	3.78 ± 0.07
Humedad	3.62 ± 0.22
Contenido de amino ácidos (g/100 g ingrediente)	
Ala	1.21 ± 0.05
Arg	1.88 ± 0.12
Asp	2.75 ± 0.06
Cys	0.15 ± 0.01
Glu	4.19 ± 0.12
Gly	0.97 ± 0.04
His	0.38 ± 0.02
Ile	0.72 ± 0.12
Leu	1.45 ± 0.09
Lys	1.75 ± 0.10
Met	0.24 ± 0.01
Phe	0.88 ± 0.04
Pro	1.89 ± 0.20
Ser	1.26 ± 0.02
Thr	0.91 ± 0.05
Tyr	0.71 ± 0.02
Val	1.07 ± 0.11

ELN, Extracto libre de nitrógeno.

Las semillas del género *Lathyrus* son deficientes en metionina, pero disponen de un alto aporte de lisina (Hanbury *et al.*, 2000; Grela *et al.*, 2012), como así se refleja en la Tabla 2. El perfil de los aminoácidos de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 3. La optimización del balance de aminoácidos en los alimentos acuícolas es esencial si se quiere lograr un crecimiento óptimo de los peces y una producción eficiente, particularmente cuando se alimenta con dietas que no están basadas en harina de pescado (Gatlin *et al.*, 2007). Las dietas experimentales no

presentaron diferencias significativas en los aminoácidos de metionina y lisina, tomando en cuenta la disposición de estos aminoácidos en la harina de titarro. En cuanto a los cinco aminoácidos (Ala, Asp, Glu, Gly, Leu) que presentaron diferencias significativas en las dietas, únicamente la leucina se encuentra catalogado como esencial en el crecimiento en trucha arcoíris y en todas las dietas experimentales está en mayor cantidad al requerimiento (Leu 1.4; Hardy *et al.*, 2002).

Tabla 3. Perfil de aminoácidos de las dietas experimentales.

	Dietas					
	Control	T 8	T 16	T 33	T 66	T 100
Contenido de aminoácidos (g/100 g ingrediente)						
Ala	2.07 ± 0.01 ^a	2.07 ± 0.00 ^a	1.93 ± 0.11 ^{ab}	1.93 ± 0.03 ^{ab}	1.88 ± 0.07 ^{ab}	1.86 ± 0.02 ^b
Arg	2.10 ± 0.01	2.12 ± 0.05	1.97 ± 0.01	1.99 ± 0.01	1.92 ± 0.01	1.87 ± 0.02
Asp	3.40 ± 0.06 ^a	3.37 ± 0.03 ^a	2.96 ± 0.11 ^b	2.93 ± 0.06 ^b	2.78 ± 0.00 ^{bc}	2.69 ± 0.04 ^c
Cys	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.00	0.34 ± 0.00	0.35 ± 0.00
Glu	8.21 ± 0.11 ^{bc}	8.25 ± 0.08 ^{bc}	7.65 ± 0.25 ^c	8.07 ± 0.22 ^{bc}	8.54 ± 0.09 ^b	9.20 ± 0.08 ^a
Gly	1.91 ± 0.04 ^{ab}	1.90 ± 0.01 ^{ab}	1.95 ± 0.10 ^{ab}	2.02 ± 0.06 ^a	1.98 ± 0.02 ^{ab}	1.77 ± 0.05 ^b
His	1.03 ± 0.38	1.09 ± 0.44	1.52 ± 0.32	1.21 ± 0.08	1.31 ± 0.08	1.27 ± 0.09
Ile	1.77 ± 0.01	1.80 ± 0.10	1.65 ± 0.03	1.62 ± 0.06	1.65 ± 0.01	1.63 ± 0.13
Leu	2.89 ± 0.07 ^a	2.92 ± 0.03 ^a	2.63 ± 0.05 ^b	2.63 ± 0.07 ^b	2.64 ± 0.00 ^b	2.73 ± 0.05 ^{ab}
Lys	2.81 ± 0.06	2.84 ± 0.02	2.87 ± 0.12	2.73 ± 0.11	2.87 ± 0.05	2.95 ± 0.08
Met	1.13 ± 0.10	1.16 ± 0.10	1.03 ± 0.11	1.08 ± 0.04	1.17 ± 0.09	1.12 ± 0.03
Phe	1.96 ± 0.15	1.95 ± 0.20	1.98 ± 0.10	1.93 ± 0.02	1.96 ± 0.04	2.00 ± 0.02
Pro	1.08 ± 0.01	1.13 ± 0.02	1.07 ± 0.00	1.19 ± 0.05	1.17 ± 0.04	1.26 ± 0.03
Ser	1.38 ± 0.31	1.57 ± 0.31	1.26 ± 0.28	1.28 ± 0.36	1.23 ± 0.10	1.59 ± 0.29
Thr	1.28 ± 0.11	1.35 ± 0.12	1.13 ± 0.07	1.14 ± 0.12	1.11 ± 0.05	1.24 ± 0.12
Tyr	1.02 ± 0.03	1.12 ± 0.01	1.12 ± 0.19	1.10 ± 0.09	1.08 ± 0.02	1.16 ± 0.06
Val	2.42 ± 0.04	2.36 ± 0.05	2.19 ± 0.10	2.20 ± 0.09	2.24 ± 0.05	2.21 ± 0.13

En el titarro se ha evaluado el contenido de azúcares solubles (ej. Sucrosa, Ciceritol, Galactinol y Rafinosa, entre otros; Martín-Pedrosa *et al.*, 2016), indicando contenidos similares a los descritos en otras leguminosas. En este estudio, se caracterizó el contenido de PNAs y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. La fracción total (soluble + insoluble) se encuentra representada mayormente por los monosacáridos de glucosa (3.82 ± 0.36 mg/g de ingrediente) y arabinosa (2.79 ± 0.33 mg/g de ingrediente). La dificultad de digerir esta fracción de carbohidratos (PNAs) puede generar efectos negativos, tales como modificar la viscosidad del alimento, afectar

la fisiología y/o morfología del intestino y la composición de la microbiota intestinal (Sinha *et al.*, 2011).

Tabla 4. Contenido de polisacáridos no amiláceos en la harina de titarro (*Lathyrus cicera*).

PNAs (mg/g ingrediente)	Soluble	Insoluble	Total
Ácido galacturónico	0.46 ± 0.22	1.71 ± 0.20	2.28 ± 0.46
Arabinosa	0.84 ± 0.18	1.98 ± 0.18	2.79 ± 0.33
Fucosa	Nd	Nd	Nd
Galactosa	0.14 ± 0.04	0.24 ± 0.05	0.38 ± 0.05
Glucosa	0.79 ± 0.18	3.15 ± 0.32	3.82 ± 0.36
Manosa	0.26 ± 0.05	Nd	0.26 ± 0.05
Ramnosa	Nd	Nd	Nd
Xilosa	0.31 ± 0.13	0.68 ± 0.12	1.03 ± 0.17
Total	2.78 ± 0.46	7.68 ± 0.66	10.40 ± 0.84

PNAs, Polisacáridos no amiláceos. Nd, No detectado.

Índices de crecimiento

A pesar de que algunas especies del género *Lathyrus* se han utilizado como parte de la alimentación en humanos y en la crianza de animales (Hanbury *et al.*, 2000; White *et al.*, 2002), existen pocos estudios que hayan evaluado su aporte nutricional y sus efectos en peces, limitándose a la especie de *L. sativus* (Barse *et al.*, 2004; Ramachandran *et al.*, 2005; Ramachandran y Ray, 2008). Los resultados en carpa (*Labeo rohita*) demostraron como las técnicas de pre-tratamiento tales como la fermentación, pueden mejorar la inclusión de la harina, que permitió una inclusión del 30% de la harina (*L. sativus*) sin afectar al crecimiento de las carpas. En el caso de la harina de titarro procedente de *L. cicera*, solamente se ha evaluado la digestibilidad aparente de la proteína en trucha arcoíris (Magalhães *et al.*, 2016). En dicho estudio se evaluaron el CDA de la proteína de seis tipos de leguminosas registradas y comercializados en la Unión Europea (PVD, 2022). La harina de titarro resultó con un CDA proteína de 0.969, el segundo mejor después del obtenido en la harina de guisante (*Pisum sativum*; CDA proteína de 1.000). También evaluaron el CDA proteína cuando las harinas se incorporaban al 30% en la dieta de referencia, resultando en este caso un valor de 0.917, mayor al valor obtenido en la dieta de referencia (CDA proteína 0.906). Los autores consideran que la harina de titarro podría ser un ingrediente potencialmente a utilizar en los alimentos de especies con hábitos carnívoros.

En el presente experimento, los resultados del crecimiento de trucha arcoíris alimentadas con titarro y la digestibilidad aparente de la proteína se muestran en la Tabla 5. Solo los peces alimentados con la sustitución total (100%) de harina de soya por harina de titarro (Dieta T100) presentaron unos valores significativamente menores en los parámetros de crecimiento como peso final (PF, 100.5 ± 5.8 g), longitud furcal final (LFF, 20.2 ± 0.4 cm), ganancia en peso (GP, $20.2 \pm 0.4\%$), tasa de crecimiento instantánea (TCI, 2.53 ± 0.07 %/día) y factor de conversión alimenticio (FCA, 1.00 ± 0.04), con respecto a los índices de crecimiento de los peces alimentados con la dieta Control (PF, 150.7 ± 2.3 g; LFF, 22.7 ± 0.2 cm; GP, 1357.8 ± 18.2 ; TCI, 2.98 ± 0.01 ; FCA, 0.79 ± 0.01 ; ANOVA, $p > 0.05$). La afectación del crecimiento en los peces por los altos porcentajes de inclusión y/o sustituciones de las harinas vegetales podrían deberse principalmente a la presencia de FANs, de carbohidratos no digeribles, o la baja digestibilidad de la proteína aportada por el titarro, entre otros (Francis *et al.*, 2001; Glencross *et al.*, 2012). Si bien en estudios anteriores la incorporación de un 30% de harina de titarro mostró resultados prometedores no afectando a la digestibilidad aparente de la proteína (Magalhães *et al.*, 2016), nuestros resultados mostraron que esta solo se ve reducida cuando la sustitución de la harina de soya por harina de titarro es del 100% (dieta T100).

Tabla 5. Índices de crecimiento y eficiencia en el uso del alimento en trucha arcoíris.

Dietas	Control	T 8	T 16	T 33	T 66	T 100
PI (g)	10.4 ± 0.1	10.3 ± 0.1	10.4 ± 0.1	10.3 ± 0.2	10.4 ± 0.1	10.3 ± 0.1
LFI (cm)	9.5 ± 0.1	9.4 ± 0.1	9.5 ± 0.1	9.4 ± 0.1	9.4 ± 0.1	9.4 ± 0.1
Biomasa (g)	2075.8 ± 80.3 ^a	2019.73 ± 198.8 ^a	2035.2 ± 124.9 ^a	1978.2 ± 54.2 ^a	1950.2 ± 132.7 ^a	1352.6 ± 87.4 ^b
PF (g)	150.7 ± 2.3 ^a	144.9 ± 13.2 ^a	146.1 ± 8.3 ^a	142.1 ± 3.6 ^a	140.4 ± 8.7 ^a	100.5 ± 5.8 ^b
LFF (cm)	22.7 ± 0.2 ^a	22.4 ± 0.6 ^a	22.3 ± 0.4 ^a	22.0 ± 0.1 ^a	22.1 ± 0.3 ^a	20.2 ± 0.4 ^b
GP (%)	1357.8 ± 18.2 ^a	1313.7 ± 136.3 ^a	1308.6 ± 87.1 ^a	1285.4 ± 36.6 ^a	1254.6 ± 97.7 ^a	871.9 ± 60.1 ^b
TCI (%/día)	2.98 ± 0.01 ^a	2.94 ± 0.11 ^a	2.94 ± 0.07 ^a	2.91 ± 0.04 ^a	2.89 ± 0.08 ^a	2.53 ± 0.07 ^b
FCA	0.79 ± 0.01 ^a	0.80 ± 0.03 ^a	0.80 ± 0.02 ^a	0.81 ± 0.01 ^a	0.83 ± 0.03 ^a	1.00 ± 0.04 ^b
FC	1.29 ± 0.02 ^a	1.29 ± 0.02 ^a	1.31 ± 0.01 ^a	1.33 ± 0.01 ^a	1.30 ± 0.03 ^a	1.23 ± 0.01 ^b
IH (%)	1.42 ± 0.12 ^a	1.35 ± 0.04 ^{ab}	1.30 ± 0.08 ^{ab}	1.20 ± 0.10 ^{ab}	1.13 ± 0.02 ^b	1.29 ± 0.09 ^{ab}
IV (%)	12.00 ± 0.90	11.81 ± 0.58	11.16 ± 0.28	10.87 ± 0.25	10.19 ± 2.62	11.69 ± 1.52
Digestibilidad aparente de la proteína (%)						
CDAproteína ¹	92.89 ± 0.18 ^{a,b}	91.66 ± 0.18 ^{b,c}	94.38 ± 0.52 ^a	91.91 ± 0.98 ^b	93.88 ± 0.38 ^a	90.03 ± 0.84 ^c

Valores expresados en media ± desviación estándar. Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas entre los grupos experimentales (ANOVA, $p > 0.05$; $n=3$). PI, peso inicial (g); LFI, longitud furcal inicial (cm); PF, peso final (g); LFF, longitud furcal final (cm); GP, ganancia en peso (%); TCI, tasa de crecimiento instantánea (%/día); FCA, factor de conversión alimenticio; FC, Factor de condición; Índice hepatosomático (%), Índice viscerosomático (%). ¹Coefficiente de digestibilidad aparente de la proteína.

En estudios previos se ha evaluado la incorporación de *L. sativus* en dietas para larvas de carpas (*Labeo rohita*) en porcentajes de 10 al 40% cuando esta no había sido tratada o fermentada. Se reporta que es posible incorporar en la fórmula hasta un 30% de la harina de *L. sativus* cuando es fermentada sin verse afectado el crecimiento, en comparación con la inclusión del 10% en condiciones normales de las semillas (Ramachandran *et al.*, 2005). Además de la fermentación, también se han ensayado otros pre-tratamientos en *L. sativus*, como la extrusión, germinación y el auto-clavado. La fermentación y extrusión son tratamientos efectivos en la remoción y/o reducción de FANs y en la eliminación del agente neurotóxico β -ODAP (Ramachandran y Ray, 2008; Sacristán *et al.*, 2015). Dichos resultados han sugerido la posibilidad de conseguir altos porcentajes de inclusión y/o sustitución en los alimentos para peces, sin tener efectos adversos por ser una de las especies con menor contenido del agente β -ODAP (Llorent-Martínez *et al.*, 2017). En el presente estudio, se ha observado que un alto porcentaje de sustitución de la harina de soja por

titarro en alimentos para trucha arcoíris es posible hasta en un 60%, incluso sin pretratamiento con fermentación. Si bien, no se observaron posibles efectos de latirismo en los peces, serán necesarios estudios más específicos para confirmar la ausencia del compuesto en el filete y la enfermedad en los animales.

Análisis postprandial de glucosa y triglicéridos

Los niveles de glucosa y triglicéridos en plasma se muestran en la Tabla 6. Tras la alimentación, se observa un efecto de hipoglucemia en los peces alimentados con los mayores porcentajes de sustitución de harina de soya por harina de titarro (Dietas T66 y T100) cuando se comparan con los valores obtenidos en los peces alimentados con la dieta Control. La probable explicación de estos resultados podría estar relacionada con el tipo de carbohidratos presente en los alimentos, en donde los PNAs son digeridos con más dificultad en comparación con los carbohidratos de tipo sacáridos (ej. monosacáridos, disacáridos, polisacáridos) y/o almidón, que son mayormente digeribles y de fácil absorción (Krogdahl *et al.*, 2005). Por lo tanto, la presencia de PNAs podría estar relacionada con el nivel postprandial de glucosa en sangre y el menor crecimiento en los peces alimentados con la dieta T100.

Ante un exceso de glucosa en sangre, este se puede almacenar en reservas de glucógenos o bien convertirse en lípidos, mediante las rutas metabólicas de glucogénesis y lipogénesis, respectivamente (Polakof *et al.*, 2012). En este estudio, únicamente se midieron los niveles de triglicéridos en plasma, los cuales presentan diferencias significativas con el incremento de la sustitución de la harina de soya por titarro, comparados con los valores obtenidos en los peces alimentados con la dieta Control, y proporcionales al nivel de glucosa en sangre. Estas diferencias se aprecian únicamente en los puntos de muestreo de 3 y 6 horas después de la alimentación. De qué modo la sustitución de harina de soya por harina de titarro altera el perfil de triglicéridos postprandial aún es desconocido, y estudios posteriores son necesarios para identificar los mecanismos involucrados.

Tabla 6. Análisis postprandial de glucosa y triglicéridos en plasma de trucha arcoíris alimentadas con las dietas experimentales.

Parámetros	Dietas	Tiempo (horas)		
		0	3	6
Glucosa (mg/dL)	Control	100.2 ± 13.2 ^a	100.4 ± 10.2 ^{ab}	79.9 ± 2.4 ^{ab}
	T8	93.5 ± 12.0 ^a	117.3 ± 12.1 ^a	71.4 ± 5.2 ^{bc}
	T16	81.7 ± 2.9 ^{ab}	90.5 ± 7.8 ^{bc}	86.3 ± 4.6 ^a
	T33	81.1 ± 8.5 ^{ab}	80.5 ± 3.9 ^{bc}	71.5 ± 8.7 ^{bc}
	T66	66.9 ± 7.2 ^b	73.6 ± 10.0 ^c	69.5 ± 6.3 ^{bc}
	T100	67.8 ± 5.3 ^b	73.8 ± 7.5 ^c	62.5 ± 3.1 ^c
Triglicéridos (mg/dL)	Control	273.6 ± 85.6	377.8 ± 48.0 ^a	369.6 ± 52.2 ^a
	T8	225.6 ± 29.8	229.7 ± 36.5 ^b	314.8 ± 31.3 ^{ab}
	T16	260.1 ± 43.9	213.3 ± 49.7 ^{bc}	292.6 ± 12.1 ^b
	T33	225.6 ± 68.8	223.0 ± 20.8 ^{bc}	180.3 ± 14.6 ^c
	T66	260.1 ± 43.9	203.7 ± 48.3 ^{bc}	177.3 ± 35.5 ^c
	T100	225.6 ± 68.8	134.8 ± 24.7 ^c	219.3 ± 12.3 ^c

Valores expresados en media ± desviación estándar. Las letras en el superíndice de cada columna indican diferencias significativas entre los grupos experimentales (ANOVA, $p > 0.05$; $n = 3$).

Conclusiones

Hasta el momento, los resultados de crecimiento sugieren que la harina de soya se podría reemplazar hasta un 66% por la harina de titarro en los alimentos de la etapa juvenil de trucha arcoíris. No obstante, aún son necesarios otros estudios para determinar la seguridad en la sustitución de la harina de soya por harina de titarro, como son el análisis histológico del sistema digestivo (hígado, intestino proximal y distal) y/o los relacionados con la calidad nutricional del filete (composición proximal y perfil de aminoácidos). También como perspectivas de futuro importantes se considera la evaluación de los perfiles de ácidos grasos en músculo, así como los posibles pre-tratamientos de la harina de titarro para reducir y/o eliminar los FANs y mejorar la bioaccesibilidad y/o biodisponibilidad de nutrientes (ej. carbohidratos no digeribles). Sin duda, los beneficios en la utilización de materias alternativas de producción local como el titarro son diversos, destacando que el proceso de manufactura presenta un menor costo de producción y la activación de la economía circular. También ayudaría reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (CO₂) por las importaciones y a evitar la dependencia de materias primas de terceros países.

Referencias

- AOAC. (1990). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 15th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, USA.
- Barse A.V., Jadhao S.B., Sahu N.P., Srivastava P.P., Jain K.K., Pal, A.K. (2004). Responses of *Labeo rohita* to dietary *Lathyrus sativus* seeds. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 17, 127–130. <https://doi.org/10.5713/ajas.2004.127>
- Brett J.R. and Groves T.D.D. (1979). Physiological energetics, *Fish Physiology*. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60029-1](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60029-1)
- Cho C., Slinger S., Bayley H. (1982). Bioenergetics of salmonid fishes: Energy intake, expenditure and productivity. *Comp. Biochem. Physiol.* 73, 25–41. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90198-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90198-5)
- Dawood, M.A. and Koshio, S. (2019). Application of fermentation strategy in aquafeed for sustainable aquaculture. *Rev. Aquac.* 12, 987–1002. <https://doi.org/10.1111/raq.12368>
- De Visser C.L.M., Schreuder R., Stoddard F. (2014). The EU's dependency on soya bean import for the animal feed industry and potential for EU produced alternatives. *OCL*. 21, 4, D407. <https://doi.org/10.1051/ocl/2014021>
- Francis G., Makkar H.P., Becker K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*. 199, 197–227. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9)
- Gatlin D.M., Barrows F.T., Brown P., Dabrowski K., Gaylord T.G., Hardy R.W., Herman E., Hu G., Krogdahl Å., Nelson R., Overturf K., Rust M., Sealey W., Skonberg D., Souza E.J., Stone D., Wilson R., Wurtele E. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. *Aquac. Res.*, 38, 551–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>
- Glencross B., Rutherford N., Bourne N. (2012). The influence of various starch and nonstarch polysaccharides on the digestibility of diets to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 356–357, 141–146.
- Grela E.R., Rybiński W., Matras J., Sobolewska S. (2012). Variability of phenotypic and morphological characteristics of some *Lathyrus sativus* L. and *Lathyrus cicera* L. accessions and nutritional traits of their seeds. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 59, 1687-1703. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9791-5>
- Hammer K., Laghetti G., Drenzo P., Castelli A. (2018). Resources and opportunities for re-establishing *Lathyrus cicera* L. as a multipurpose cultivated plant. *Genet Resour Crop Evol.* 66, 523-544. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0717-3>
- Hanbury C. and Hughes B. (2003). *Lathyrus cicera* as quality feed for laying hens. *Lathyrus Lathyrism Newsletter* 3. pp. 44-46. CLIMA, University of Western Australia.
- Hanbury C.D., White C.L., Mullan B.P., Siddique K.H.M. (2000). A review of the potential of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. grain for use as animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87, 1-27. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00186-3](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00186-3)
- Hardy, R.W. (2002) Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Webster, C.D. and Lim, C., Eds., *Nutrient requirements and feeding of aquaculture fish*, CAB International Publishers, New York, 184-202. doi:10.1079/9780851995199.0184

- Hemre G.-I., Amlund H., Aursand M., Bakke A.M., Olsen R.E., Ringø E., Svihus B., Bernhoft A., Jenssen B.M., Møretrø T., Nesse L.L., Torrissen O. (2018). Criteria for safe use of plant ingredients in diets for aquacultured fish. *Eur. J. Nutr. Food Saf.* 8, 240–242. <https://doi.org/10.9734/EJNFS/2018/43861>
- Kokou F. and Fountoulaki E. (2018) Aquaculture waste production associated with antinutrient presence in common fish feed plant ingredients. *Aquaculture*, 495, 295–310. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.003>
- Krogdahl Å., Hemre G.-I., Mommsen T. (2005), Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition*, 11: 103-122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x>
- Król E., Douglas A., Tocher D.R., Crampton V.O., Speakman J.R., Secombes C.J., Martin S.A.M. (2016). Differential responses of the gut transcriptome to plant protein diets in farmed Atlantic salmon. *BMC Genomics* 17, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2473-0>
- Llorent-Martínez E.J., Ortega-Barrales P., Zengin G., Mocan A., Simirgiotis M.J., Ceylan R., Uysal S., Aktumsek A. (2017). Evaluation of antioxidant potential, enzyme inhibition activity and phenolic profile of *Lathyrus cicera* and *Lathyrus digitatus*: Potential sources of bioactive compounds for the food industry. *Food Chem. Toxicol.* 107, 609-619. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.002>
- Magalhães S.C.Q., Cabrita A.R.J., Valentão P., Andrade P.B., Rema P., Maia M.R.G., Valente L.M.P., Fonseca A.J.M. (2016). Apparent digestibility coefficients of European grain legumes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquacult Nutr.*, 24:332–340. <https://doi.org/10.1111/anu.12564>
- Martín-Pedrosa M., Varela A., Guillamon E., Cabellos B., Burbano C., Gomez-Fernandez J., de Mercado E., Gomez-Izquierdo E., Cuadrado C., Muzquiz, M. (2016). Biochemical characterization of legume seeds as ingredients in animal feed. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14, 1, e0901. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2016141-7450>.
- Mullan B.P., Pluske J.R., Trezona M., Harris D.J., Allen J.G., Siddique K.H.M., Hanbury, C.D., Barneveld R.J. Van Kim, J.C. (2009). Chemical composition and standardised ileal digestible amino acid contents of *Lathyrus (Lathyrus cicera)* as an ingredient in pig diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150, 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.07.005>
- Nie P., Hallerman E. (2021). Advancing the sustainability of aquaculture. *Rev. Aquac.* 13, 781–782. <https://doi.org/10.1111/raq.12548>
- OJEU. (2009). Laying down the Methods of Sampling and Analysis for the Official Control of Feed, Commission Regulation (EC) No 152/2009. Available online: <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/152/oj> (accessed on 01 Feb 2022).
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., *et al.* (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Experimental Physiology*. 105, 1459– 1466. <https://doi.org/10.1113/EP088870>
- Peres H., Lim C., Klesius P.H. (2003). Nutritional value of heat-treated soybean meal for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 225, 67–82. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00289-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00289-8)
- Polakof S., Panserat S., Soengas J.L., Moon T.W. (2012). Glucose metabolism in fish: a review. *J Comp Physiol.* 182, 1015–1045. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0658-7>

- PVD. (2022). Plant Variety Database - European Commission. Retrieved from http://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/plant_variety_catalogues_databases/search/public/index.cfm (accessed on 01 Feb 2022).
- Ramachandran S., & Ray A.K. (2008). Effect of different processing techniques on the nutritive value of grass pea, *Lathyrus Sativus* L., seed meal in compound diets for indian major carp rohu, *Labeo Rohita* (Hamilton), Fingerlings. Corpus ID: 85741128. <https://doi.org/10.2478/s10086-008-0016-2>
- Ramachandran S., Bairagi A., Ray A.K. (2005). Improvement of nutritive value of grass pea (*Lathyrus sativus*) seed meal in the formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings after fermentation with a fish gut bacterium 96, 1465–1472. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.002>
- Sacristán M., Varela A., Pedrosa M.M., Burbano C., Cuadrado C., Legaz M.E., Muzquiz M. (2015). Determination of β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid and homoarginine in *Lathyrus sativus* and *Lathyrus cicera* by capillary zone electrophoresis. *J. Sci. Food Agric.*, 95: 1414-1420. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6792>
- Sinha A.K., Kumar V., Makkar H.P.S., De Boeck G., Becker K. (2011). Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition - A review. *Food Chem.* 127, 1409–1426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.042>
- Toledo-Solís F.J., Hilerio-Ruíz A.G., Martínez P.F., Barrios A., Aznar M.J., Larrán A.M., Fernández I., Moyano F.J. (2022). Selection and improvement of 1 alternative raw materials for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) aquafeeds through a multiparametric screening tool. *Anim. Feed Sci. Technol.* ANIFEE-D-21-00721R1 in review.
- Tomás-Almenar C., Toledo-Solís F.J., Larrán A.M., de Mercado E., Alarcón F.J., Rico D., Martín-Diana A.B., Fernández I. (2020). Effects and safe inclusion of narbonne vetch (*Vicia narbonensis*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: Towards a more sustainable aquaculture. *Animals.* 10, 1–19. <https://doi.org/10.3390/ani10112175>
- Vlachostergios D.N., Lithourgidis A.S., Dordas C.A. (2018). Agronomic, forage quality and economic advantages of red pea (*Lathyrus cicera* L.) intercropping with wheat and oat under low-input farming. *Grass Forage Sci.* 73: 777– 788. <https://doi.org/10.1111/gfs.12348>
- White C.L., Hanbury C.D., Young P., Phillips N., Wiese S.C., Milton J., Davidson R.H., Siddique K., Harris D. (2002). The nutritional value of *Lathyrus cicera* and *Lupinus angustifolius* grain for sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 99, 45-64. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00035-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00035-4)

Comparative Analysis of Soybean Meal Effects in Commercial Strains of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*

Tsung-Yu Tsai^a, Hector Hernandez^b, Kenneth E. Overturf^c, and Madison S. Powell^{a*}

^aAquaculture Research Institute, University of Idaho, Hagerman Fish Culture Experiment Station, 3059F National Fish Hatchery Road, Hagerman, ID 83332, USA

^bLaboratorio de Producción Acuícola, UNAM-Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Iztacala, México

^cUSDA-ARS, Hagerman Fish Culture Experiment Station, 3059F National Fish Hatchery Road, Hagerman, ID 83332, USA

*Correspondence author: mpowell@uidaho.edu; +1(208)-837-9096

Summary

A strain of rainbow trout (CX strain) at the Hagerman Fish Culture Experiment Station has been selected for growth on a plant-based diet for ten generations. We compared fish from the CX strain that were age (CXA) and size (CXS) matched to three commonly available commercial strains selected for growth (RBT1, RBT2, RBT3). We compared differences in overall growth, oxidative stress and intestinal inflammation between fish fed a fishmeal (FM) or soybean-meal (SBM) diet for 12 weeks. Fish of each strain were randomly assigned to FM or SBM diet groups and fed daily to satiation. Tissues from each experimental group were sampled every four weeks to assess gene expression and growth parameters. Both CX strains had higher growth rates compared with similar feed consumption among all groups. Expression of intestinal and hepatic biomarkers for oxidative stress varied between liver and intestine. Expression varied between CXA and CXS fish despite being from the same strain indicating size at age affects gene expression and care should be taken when comparing different strains with different growth rates. Expression of calcium binding protein S100I2 in the intestine was elevated initially at 4 weeks, diminished at 8 weeks, then elevated again by 12 weeks. This pattern was also observed in intestinal SOD expression and GPx expression in the liver. Overall, these results provide further information on current commercial strains of rainbow trout to help improve the utilization on plant protein sources in their diets.

Keywords: *Enteritis, Rainbow trout, Salmonids, soybean meal, S100 gene*

1. Introduction

World aquaculture production is growing rapidly and playing an important role in providing animal protein for human consumption (FAO, 2018). Currently, the cost of fishmeal is increasing with rising world demand and it is the primary cost consideration in fish feeds. To help with limited fishmeal quantities, plant protein ingredients have been considered as protein substitutes in fish diets. Plant protein sources such as soybean meal (SBM) provide an abundant, more sustainable and an affordable alternative to fishmeal in aquafeeds. However, there are some concerns with replacing fishmeal (FM) with SBM in carnivorous fish, as it often contains anti-nutritional factors (ANFs) such as saponins resulting in distal intestine inflammation referred to as soybean meal induced enteritis (SMIE). This inflammatory response is characterized by intestinal fold height shortening, thickening of the lamina propria and submucosa thickening which is concomitant with infiltration of granulocytes (Baeverfjord & Krogdahl, 1996; Burrells *et al.*, 1999; Knudsen *et al.*, 2007; Romarheim *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015). In salmonids, replacing fishmeal with plant-based ingredients also raises concerns with carbohydrate metabolism changes because fish are generally considered “glucose intolerant” (Geay *et al.*, 2011; Panserat *et al.*, 2009). Despite soybean meal being a more sustainable and economical protein source and having an advantageous amino-acid profile, the inflammatory responses observed in some aquaculture species such as Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) limit soybean meal’s utilization to replace fishmeal as an alternative ingredient (Blaufuss *et al.*, 2019; Collins *et al.*, 2013; Krogdahl *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015).

Numerous studies have concluded that distal intestine enteritis can be attributed to various levels of ANFs remaining in plant-based meals used in high protein diets for salmonids (Krogdahl *et al.*, 2010; Venold *et al.*, 2012). One strategy to help reduce SMIE when FM is replaced by plant-based proteins, is to increase overall protein availability thus reducing the portion of plant-based proteins used and minimizing the ANFs in the diet (Gatlin *et al.*, 2007). There is also evidence that exposure of RBT to dietary challenges during early stages affects acceptance and utilization of feeds in later life stages (Balasubramanian *et al.*, 2016; Geurden *et al.*, 2013). Although ANFs have been described as one factor in a plant-based diet affecting growth (Krogdahl *et al.*, 2010), an unbalanced fatty acid profile in plant-based diets has also been shown to affect fish immunity (Turchini *et al.*, 2010). Continually changing alternative feed formulations using plant-based proteins and oils to substantially or totally replace fishmeal and fish oil continues to be problematic

while trying to avoid impairing growth performance and survival in rainbow trout (Boucher *et al.*, 2012; Callet *et al.*, 2017; Cheng *et al.*, 2003).

Genetic selection is another approach to help improve growth and utilization of plant-based feed in carnivorous fish. In rainbow trout, some genotypes have been observed to grow and survive better than others while fed a plant-based diet (Boucher *et al.*, 2012; Callet *et al.*, 2021). In addition, one strain of rainbow trout has been specifically selected for growth on an all-plant protein diet for over decade (Blaufuss *et al.*, 2019; Overturf *et al.*, 2013). This selected strain of rainbow trout (the CX strain) shows resistance to SMIE and a reduction in inflammatory responses in the distal intestine (Blaufuss *et al.*, 2019).

In this study, we compared three current commercial strains of rainbow trout to the CX strain of rainbow trout in a 12-week feeding trial. We wanted to assess how different strains of rainbow trout might show differences in resistance to SMIE and differences in utilization of plant proteins when compared to a fishmeal diet. To understand the effect of this dietary alteration on oxidative stress, expression levels of three genes (SOD, superoxide dismutase; glutathione peroxidase, GPx; and catalase) were compared in the liver and distal intestine in each RBT strain during each time point. We also examined calcium-binding protein genes expressed in the intestine (S100I2) and in the liver (S100V2) as inflammatory markers.

2. Material and Methods

2.1. Diets

Two experimental diets were formulated to provide 40% digestible protein and 20% crude lipid containing either fishmeal (FM diet) or soybean meal (PM diet) as the primary protein source (Table 1). Both diets were balanced for digestible protein and supplemented with essential amino acids to reach or exceed known nutrient requirements (NRC *et al.*, 2011).

Table 1. Formulations and proximate composition of control and experimental diets used in a 12 week, comparative feeding trial of rainbow trout strains.

Ingredient	FM	PM
Menhaden Fish Meal	30.00	0.00
Soybean meal	0.00	40.00
Chicken meal	11.50	11.50
Corn protein concentrate	11.50	11.50
Menhaden fish oil	14.72	16.35
Wheat gluten meal	0.16	1.30
Wheat flour	23.29	5.54
Lecithin	1.00	1.00
Stay-C 35	0.15	0.15
Vitamin premix ARS 702	1.00	1.00
TM ARS 640	0.10	0.10
NaCl	0.28	0.28
Magnesium Oxide	0.06	0.06
Potassium chloride	0.56	0.56
Monocalcium phosphate	0.60	4.80
Choline chloride 50%	1.00	1.00
DL-Methionine	0.33	0.63
Lysine HCl	2.17	2.56
Threonine	0.40	0.49
Taurine	1.00	1.00
Yttrium oxide	0.10	0.10
Astaxanthin	0.08	0.08
TOTAL	100.00	100.00
Proximate analysis (analyzed)		
Protein (%DM)	46.7	48.0
Lipid (%DM)	18.7	17.6

2.2. Fish culture and feeding

Three, same age, commercial strains of rainbow trout (RBT1, RBT2, RBT3) and size-matched Hagerman selected strain rainbow trout (CXS; approximately 2 weeks younger) collectively averaging 6.8 ± 0.49 g were stocked separately into 140 L poly tanks along with age-matched Hagerman strain rainbow trout (CXA) averaging 7.87 ± 0.14 g. Fish from each strain were

randomly assigned to 4 replicate tanks (2 tanks/diet, 30 fish/tank) in a flow-through system with spring water inflow. The water temperature was maintained at 15 °C with a 14:10 light: dark cycle during the experiment. Tanks were randomly assigned the FM or PM diet and fed twice daily to apparent satiation, 6 days per week, for 12 weeks. All fish were counted and bulk weighed every 4 weeks.

2.3. Sample collection

Initially and at weeks 4, 8, and 12, five fish from each tank were euthanized with MS-222 (250 ppm, buffered to pH 7.4; Western Chemical Co., Ferndale, WA). Samples of distal intestine and liver (~100 mg) were removed from each fish and placed in 1 ml TRIzol[®] (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) and stored frozen at -80 °C until RNA was extracted for gene expression.

2.4. RNA extraction and cDNA synthesis

For gene expression analysis, total RNA from sample tissues were extracted in the TRIzol[®] reagent. The liver or distal intestine tissues were put in 2-mL round-bottom centrifuge tubes and homogenized in a bead mill (MixerMill 200, Retsch GmbH, Hann, Germany). After homogenization, tubes were centrifuged at 12,000 g at 4 °C for ten minutes and the supernatant transferred to new 1.5 mL tubes. Chloroform (200 ul) was added to each tube and vigorously shaken for 15 seconds before incubation at room temperature for ten minutes. Tubes were then centrifuged at 12,000 g at 4 °C for 15 minutes, and the supernatant transferred to a new 1.5 mL tube. Isopropanol (500 ul) was added and mixed well before incubation at -20 °C overnight. RNA was pelleted by centrifuging at 12,000 g at 4 °C for 10 minutes, then washed with cold 75% ethanol, and resuspended in nuclease-free water. RNA quantity and purity were examined spectrophotometrically using a Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). RNA sample concentrations were adjusted with nuclease-free water to 100 nM, treated with DNase (DNase I, Invitrogen, Carlsbad, USA), and reverse transcribed into cDNA (High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) using the manufacturer's instructions. Resulting cDNAs were stored at -80 °C for further analysis.

2.5. Quantitative PCR and data analysis

All samples were run in duplicate using a 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Fast SYBR[™] Green Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, USA) was used according to the manufacturer's instructions along with 40nM of each primer and 10 ng of template cDNA. After amplification, a melt curve was used to check the specificity of the

qPCR product. A standard curve with a 7-point, fivefold dilution series was used with pooled total RNA from all samples. Expression efficiencies ranged from 97-103%. Primers for reference and target genes are shown in Table 2. Target genes were normalized against the reference gene RPS15 and quantified using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak & Schmittgen, 2001). Growth parameters and gene expression were analyzed with one-way and two-way ANOVA using the “AOV” procedure in R Studio® version 1.2.1335 (R Studio, Inc, Boston, MA), with “Tukey HSD” *post-hoc* tests when significant differences were observed. Significance was defined at $\alpha < 0.05$ for all statistical tests.

Table 2. Primer sequences of rainbow trout genes used for qPCR in a 12 week, comparative feeding trial of rainbow trout strains.

Gene	Accession	Primers
SOD ¹	NM_001124329	<i>f. GGC ACG AGG GCA AGT AGG A</i> <i>r. GCC TTT GAG CAC GCA AAC A</i>
GPx ²	AF281338	<i>f. CGC CCA CCC ACT GTT TGT</i> <i>r. GCT CGT CGC TTG GGA ATG</i>
S100I2	XM_021598338.1	<i>f. GCT TGG AGA GAT CAT GGG GAA AA</i> <i>r. GCC ATC TGA GTT AGC GTC CA</i>
S100V2	XM_021572132.1	<i>f. TTA CGA CTG GAG CGT CAG A</i> <i>r. CCT CCA GAA GTG ATT GAA GGT G</i>
Catalase	XM_021557350.2	<i>f. GGC TTT GCA GTT AAG TTC TAC</i> <i>r. AGC ATT GCG TCC CTG ATA AA</i>
RPS-15	NM_001165174.2	<i>f. ACA GAG GTG TGG ACC TGG AC</i> <i>r. AGG CCA CGG TTA AGT CTC CT</i>

¹ SOD, superoxide dismutase; ² GPx, glutathione peroxidase

3. Results

3.1. Growth performance

On the FM diet, CXA fish averaged the highest final weight (Table 3). On PM diet, both CXA and CXS fish showed higher final weight compared to the commercial strains, and RBT3 showed significantly lower final mass despite a greater feed intake. Although not significant, the CXA fish fed both the FM and PM diets had a lower FCR compared to the other strains. The survival rate was between $0.76\text{-}0.93 \pm 0.02\%$ with no significant difference among strain and diet.

Table 3. Growth and feeding performance of rainbow trout strains fed a fishmeal or plant meal diet for 12 weeks. Differences were considered significant with $\alpha \leq 0.05$. Different letters indicate significant differences among strains within diets.

Diet	Strain	Initial Mass (g)	Final Mass (g)	Weight Gain (%)	SGR ¹	Feed Intake ²	FCR ³
Fishmeal	CXS	7.47	128.83 ^b	1624 ^b	3.37 ^b	1.71	0.96
	CXA	7.87	194.95 ^a	2377 ^a	3.80 ^a	1.46	0.76
	RBT1	4.88	131.50 ^b	2592 ^a	3.91 ^a	1.70	0.80
	RBT2	7.25	137.66 ^b	1798 ^b	3.50 ^b	1.61	0.86
	RBT3	7.27	137.54 ^b	1790 ^b	3.49 ^b	1.74	0.85
Plant meal	CXS	7.47	152.38 ^x	1939 ^{xy}	3.58 ^x	1.73 ^{xy}	0.91
	CXA	7.87	155.09 ^x	1870 ^{yz}	3.54 ^{xy}	1.52 ^{xy}	0.76
	RBT1	4.88	120.28 ^y	2362 ^x	3.80 ^x	1.64 ^{xy}	0.88
	RBT2	7.25	116.28 ^y	1503 ^{yz}	3.28 ^y	1.48 ^y	1.05
	RBT3	7.27	112.74 ^y	1449 ^z	3.24 ^y	1.92 ^x	0.99
Pooled		0.53	7.66	123.5	0.07	0.04	0.03
SEM							
P	Strain		<0.001	<0.001	<0.001	0.006	0.27
	Diet		0.005	0.007	0.008	0.78	0.25
	S × D		0.004	0.014	0.007	0.57	0.72

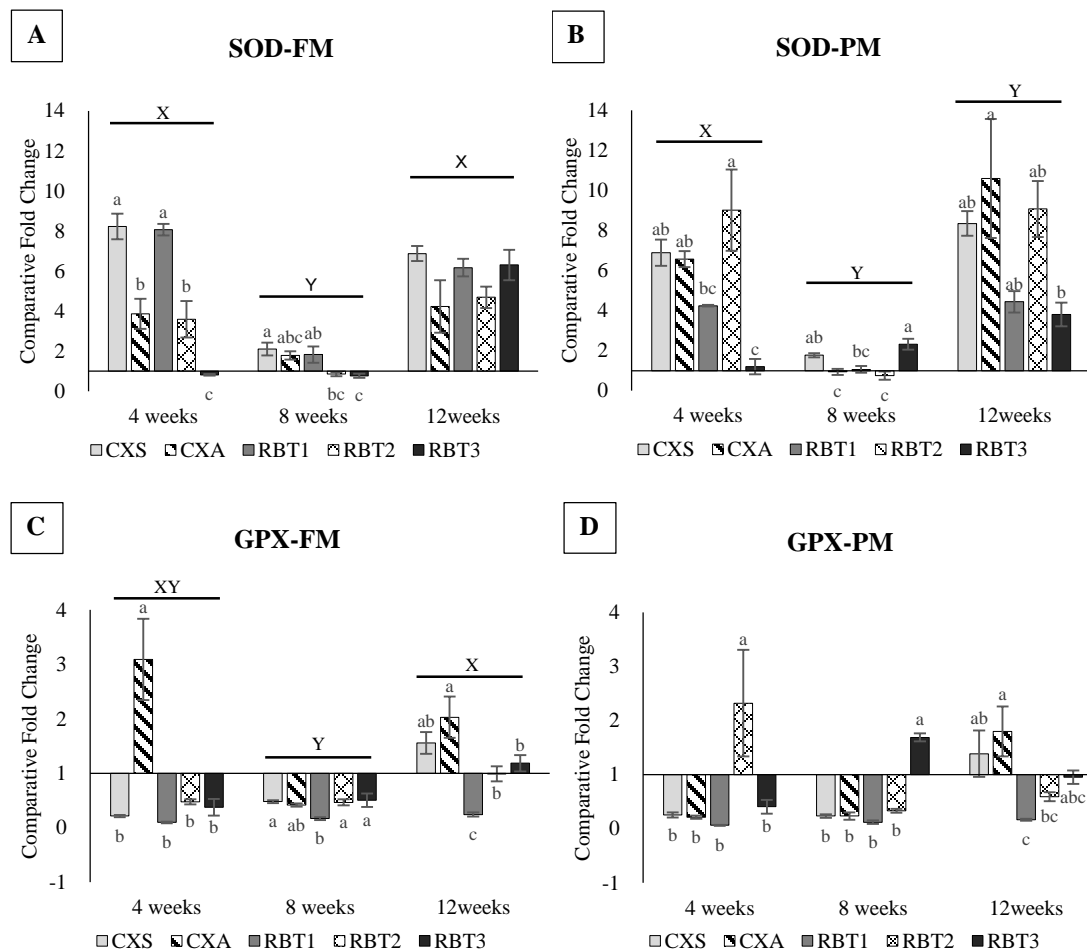
¹ Specific Growth Rate, = $100 \times (\ln W_f - \ln W_i) / t$; W_f : final fish body weight, W_i : initial fish body weight, and t : total number of days of feeding

² Feed Intake, = g dry feed consumed / average fish mass (g) / culture days

³ Feed Conversion Ratio, = g dry feed consumed / g wet weight gained

3.2. Gene expression

In the distal intestine, overall expression of SOD in both the FM and PM diet fed fish was significantly higher at week 4 and week 12 compared to week 8. With the FM diet, expression of SOD in CXS and RBT1 fish was higher than expression observed in CXA, RBT2 and RBT3 strains at 4 weeks but not significantly different among strains by week 12 (Fig. 1A). On the PM diet, expression of SOD was also downregulated at week 8 but elevated again by week 12 (Fig. 1B). The effect of strain was significant on GPx expression in the intestine over time with the FM diet (Fig. 1C). Expression of GPx in the intestine with the PM diet was variable among strains within time points but not significant over time (Fig. 1D). Catalase expression in the intestine increased significantly over time in RBT3 with both FM and PM dietary treatments (Fig. 1E and F). Catalase expression was also elevated in RBT2 over time in the PM diet treatment (Fig. 1F).



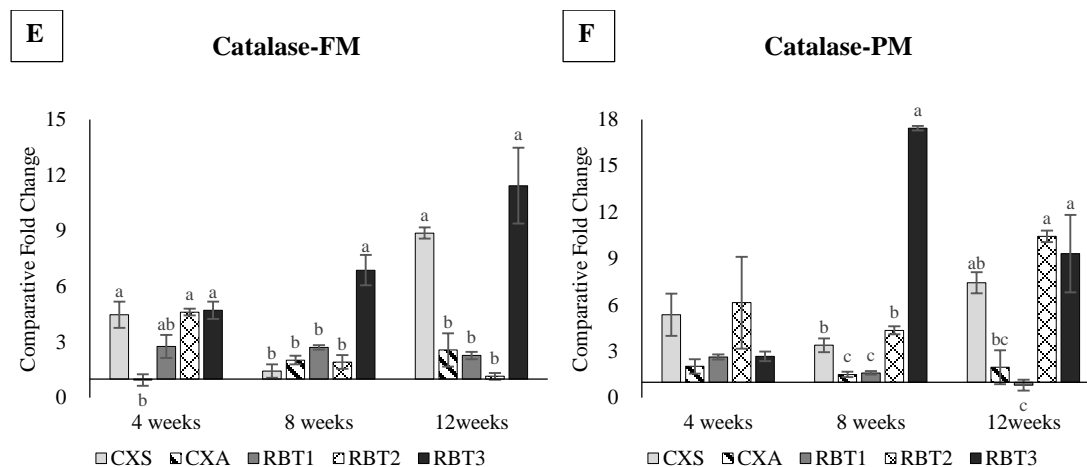


Figure 1. Comparative fold change of gene expression in distal intestine of rainbow trout strains after being fed a fishmeal (FM) or plant meal (PM) diet for 12 weeks. Differences were considered significant with $\alpha \leq 0.05$. Different letters indicate significant differences among strains within diets. Bars indicate significant differences between time points. Error bars indicate SEM.

In the liver, SOD expression was downregulated among strains on both diets except for RBT3 which showed increased expression by week 12 on the FM diet (Fig. 2A) and week 8 on the PM diet (Fig. 2B). The RBT2 strain also showed increased expression at week 12 on the PM diet (Fig. 2B). The expression of GPx was significantly different over time with all strains on both the FM and PM diets with lower expression again observed at week 8 (Fig. 2C and D). A significant time effect was present with the expression of catalase in both FM and PM diets, with higher expression at week 4 and expression diminishing to initial levels (time 0) by week 8 in both diets (Fig. 2E and F).

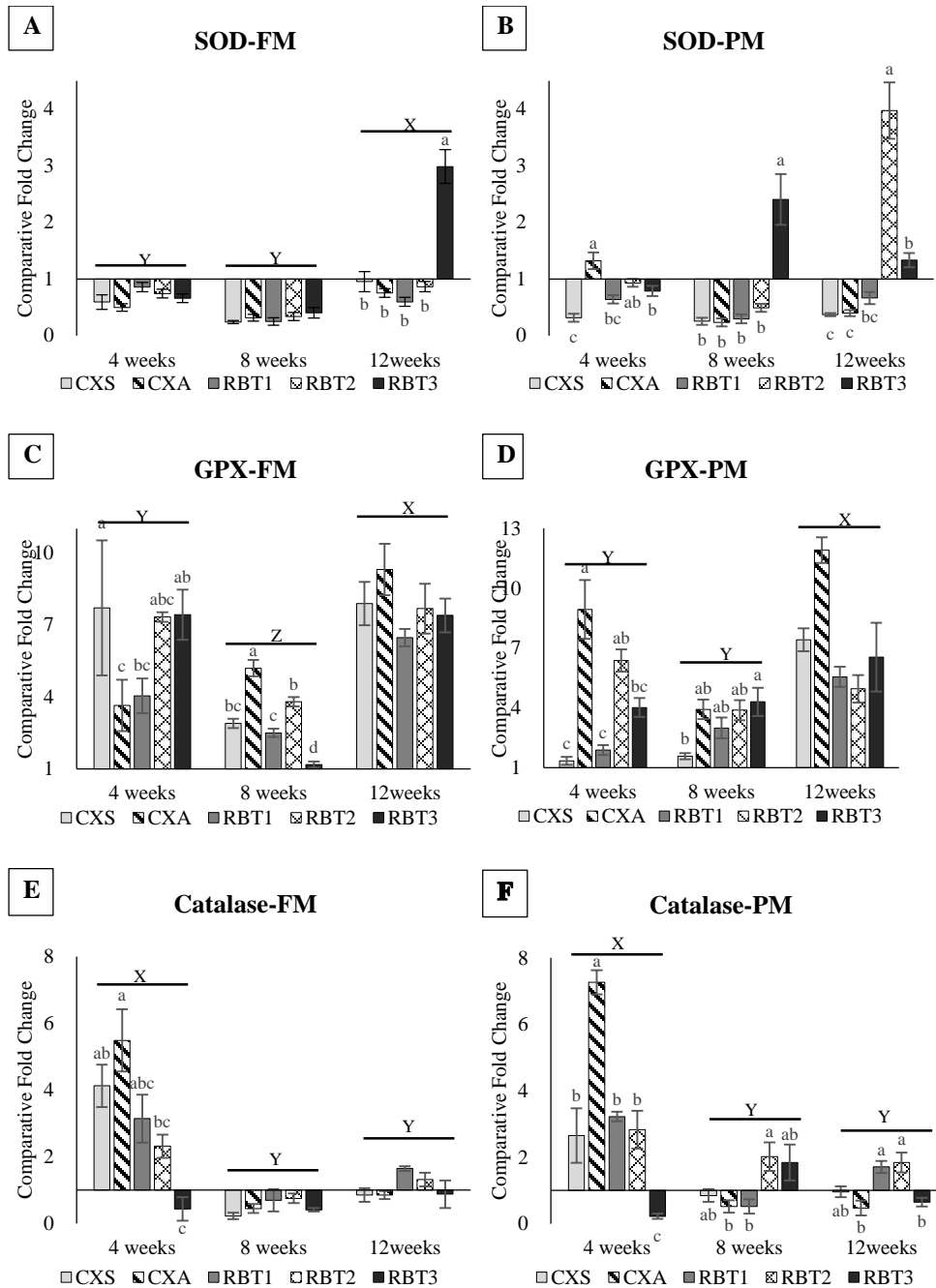


Figure 2. Comparative fold change of gene expression in the liver of rainbow trout strains after being fed a fishmeal (FM) or plant meal (PM) diet for 12 weeks. Differences were considered significant with $\alpha \leq 0.05$. Different letters indicate significant differences among strains within diets. Bars indicate significant differences between time points. Error bars indicate SEM.

Strain and time effect were significant for expression of S100I2 in the intestine of fish fed both FM and PM diets. Overall expression was lower by week 8 with significant upregulation of S100I2

observed in RBT1 in week 12 on both diets (Fig. 3A and B). Both strain and time effect were significant with expression of S100V2 in the liver of fish fed the FM and PM (Fig. 4A and B). Overall expression was higher at week 4 and diminished over time in all strains by week 12.

4. Discussion

Rainbow trout selected for increased utilization of plant protein diets (CXS, CXA) showed superior growth compared to the other commercial strains (RBT1, RBT2, and RBT3) on both FM and PM diets after twelve weeks (Table 3). Similar results have been observed in previous feeding trials using this selected strain when fishmeal was replaced with up to 40% SBM (Blaufuss *et al.*, 2019; 2020; Overturf *et al.*, 2013). Advantages of these selected rainbow trout was first reported by Venold *et al.*, 2012, where they examined the level of fatty acid binding protein and enterocyte proliferation rate to define the different responses with 4th generation CX select line fish and non-selected rainbow trout. Callet *et al.*, 2021 recently showed transcriptome profiles differ along with growth performance within three isogenic lines of RBT with varying sensitivity to SBM suggesting sufficient genetic variation is present in RBT lines to perhaps select for further improvement in oral tolerance of SBM.

Maintaining homeostasis with variable generation of reactive oxygen species (ROS) is important for preventing oxidative injury and is maintained by superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase as the first line of antioxidant defense reducing the oxidative stress in an organism (Hoseinifar *et al.*, 2021; Livingstone, 2003). SOD, GPx and catalase are easily induced by oxidative stress, therefore their expression and enzyme activities have been used as a biomarkers to define oxidative stress in cells (van der Oost *et al.*, 2003). Anti-nutritional factors found in SBM have been linked to damage of the antioxidant system in fish (Zhang *et al.*, 2013).

In the distal intestine, we observed significant up-regulation in expression of the SOD gene in fish fed with the FM or PM diet (Fig. 1A and B). At week 8, both diet and strains showed lower SOD expression than at other time points. This up and down regulation over time has been previously observed (Blaufuss *et al.* 2019) and may indicate an adaptive response by the fish to the experimental and control diets which are different than the diet fish were fed prior to the study. The CXA and RBT1 strain showed greater expression of SOD than other strains in week 4 while fed FM diet but this pattern was unresolved by week 12. The expression of GPx in the distal

intestine was highly variable and showed overall down-regulation regardless of the diet or strain (Fig. 1C and D). At week 12, CXS and CXA fish on both FM and PM diets showed up-regulation in GPx in the distal intestine. The expression of catalase data in the distal intestine was observed a significant effect between strain and up-regulation among all-time points in FM or PM diets. Catalase expression generally increased over time but interestingly, expression differences were significant between CXS and CXA strains on both diets at all time points (Fig. 1E and F). This suggests that despite these fish being from the same cohort and same strain, significant differences remain in genetic variability between families and expression of catalase can be very time and age dependent. Comparison to similar work shows intestinal antioxidant activity was significantly higher in largemouth bass after 8 weeks fed a 28% SBM diet. Specifically, bass fed on a high-SBM diet showed about two-fold greater activity of SOD and GPx in the intestine than bass fed an FM diet (Chen *et al.*, 2021). In addition, Blaufuss *et al.*, (2019) observed up-regulation in other genes related to inflammation in distal intestine of RBT while fed a 40% SBM diet. In that study, upregulation of IL-17 was related to the commonly observed mucosal inflammatory response in salmonids. RBT fed on a 40% SBM diet showed greater expression on IL-17A/F2a, F2b, and F3 than the RBT fed an FM diet at weeks 4, 8, and 12 (Blaufuss *et al.*, 2019).

Expression of SOD in the liver showed down-regulation at weeks 4 and 8 among all strains of fish fed the FM diet (Fig. 2A). In general, variable expression of SOD in the liver was only observed in RBT2 and RBT3 of the commercial strains with both CXS and CXA fish remaining unaffected by dietary treatment. In gilthead sea bream, SOD antioxidant enzyme activity in the liver increased significantly as the FM percentage in the diet was replaced with SBM (Kokou *et al.*, 2015). The expression of SOD in the liver of Atlantic salmon was down regulated after 2 days and 17 days when the diet was changed from FM to a plant-based diet (Olsvik *et al.*, 2011). With GPx gene expression in the liver, we observed significant differences across all-time points in with fish fed the FM diet. Expression of GPx in fish fed the PM diet was variable but generally downregulated from the initial time point (time 0) (Fig. 2C and D). Both the CXS and CXA strains showed modest but significantly increased expression of GPx at week 12 regardless of diet. Previously, GPx upregulation in the liver has not been observed as a hallmark for this strain. Expression of GPx in the liver of Atlantic salmon was shown to be elevated at 17 days after FM was replaced with a plant-based diet but not on day 0 and 2 (Olsvik *et al.*, 2011). This shortened timeline may also be true for rainbow trout but we did not sample fish at two weeks.

Catalase expression in the liver was variable with both time and strain and there was a general tendency for upregulation of catalase by week 12 regardless of diet. Catalase expression between the CXA and CXS was significantly different by week 12 again suggesting as observations of GPx expression did, that age and size differences between these cohorts of the same strain convey significantly different responses to the same diet. In the liver of Atlantic salmon, increases in expression and enzyme activity of catalase was positively correlated with a plant-based diet after day 17 (Olsvik *et al.*, 2011). Catalase processes H₂O₂ to water, but GPx can also reduce lipid peroxides (Ighodaro & Akinloye, 2018). The patterns of SOD, GPx and catalase expression observed between diets and among strains may indicate variation in changes to metabolism that strains encounter over time as they detoxify H₂O₂ or reduce fatty acid peroxides.

Information on S100 gene expression in fish is limited. Calcium-binding proteins are found in the skin and mucus membranes of Atlantic salmon in both sea lice infected and non-infected fish. One of these proteins, S100I2, has been identified as ictacalcin (Easy & Ross, 2009). Channel catfish skin has been shown to have abundant S100-like calcium-binding proteins with ictacalcin comprising up to 5% of these proteins (Karsi *et al.*, 2002). Physiological relationships between adaptation to a marine environment and calcium-binding protein expression in the gut remains unclear. In marine fish, the major area of calcium uptake and homeostasis is in the gut, and thus S100 gene expression could be important when feeding anadromous RBT or Atlantic salmon feeds that contain high levels of SBM (Gregório & Fuentes, 2018). Previous work has shown the expression of calcium-binding protein genes (S100 genes) are affected by high SBM diets in RBT (Blaufuss *et al.*, 2019, 2020). In this study, expression S100I2 in the distal intestine showed a similar pattern to SOD expression over time and GPx expression over time in the liver, with overall lower expression at week 8 regardless of diet (Fig. 3A and B). Initially at week 4, S100I2 expression in both CXS and RBT1 strains was significantly upregulated regardless of diet but remained higher only in the commercial RBT1 strain after week 12. The same commercial strain of RBT was also used in a previous study (RBT1) and was observed with elevated S100I2 expression fed a high-SBM diet in that study (Blaufuss *et al.*, 2020). In the distal intestine, the CXS strain showed greater expression of S100I2 than CXA strain fed regardless of diet.

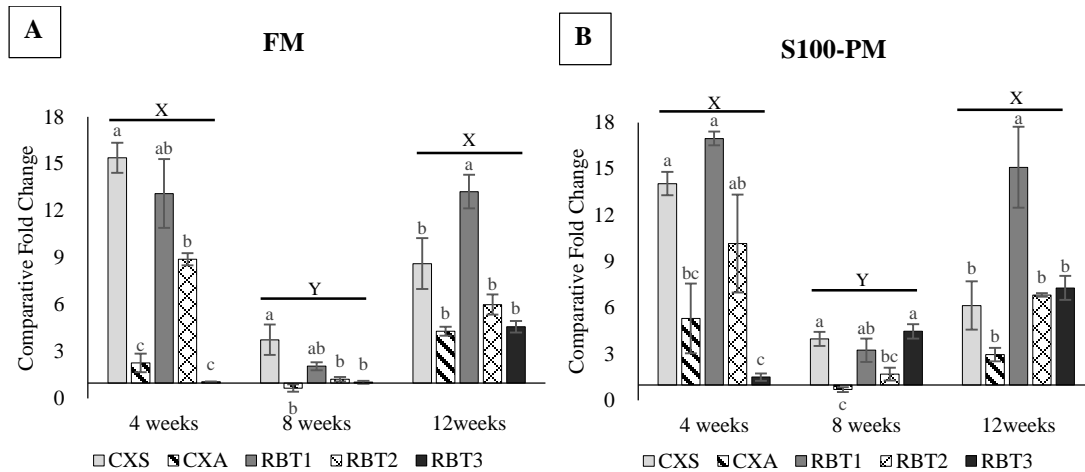


Figure 3. Comparative fold change of S100I2 gene expression in the intestine of rainbow trout strains after being fed a fishmeal (FM) or plant meal (PM) diet for 12 weeks. Differences were considered significant with $\alpha \leq 0.05$. Different letters indicate significant differences among strains within diets. Bars indicate significant differences between time points. Error bars indicate SEM.

In previous work, S100V2 gene upregulation was observed in the liver when RBT were fed a high-SBM diet (Blaufuss et al., 2019). In this study, expression of S100V2 in the liver showed a similar pattern to catalase gene expression with greater expression at week 4 regardless of diet and an overall down regulation at weeks 8 and 12 (Fig. 4 A and B).

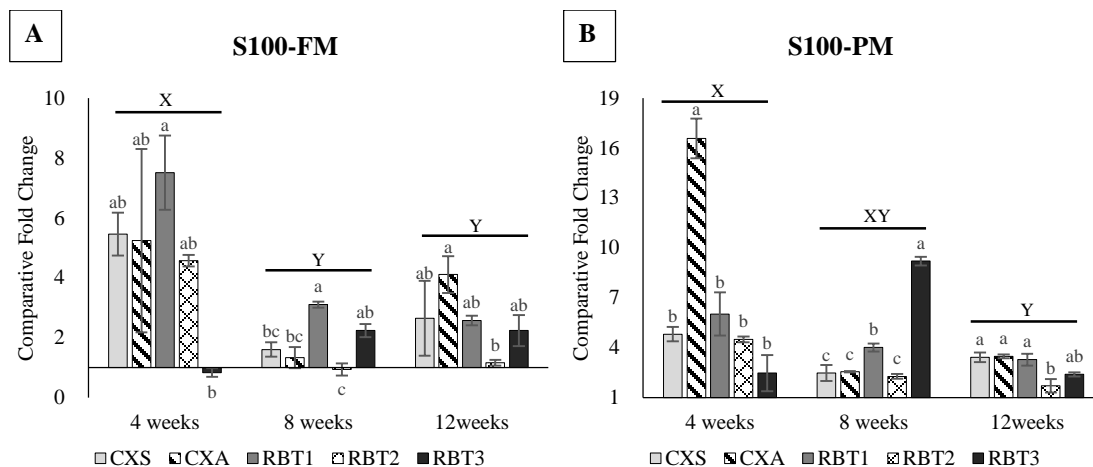


Figure 4. Comparative fold change of S100V2 gene expression in the liver of rainbow trout strains after being fed a fishmeal (FM) or plant meal (PM) diet for 12 weeks. Differences were considered significant with $\alpha \leq 0.05$. Different letters indicate significant differences among strains within diets. Bars indicate significant differences between time points. Error bars indicate SEM.

Conclusions

In summary, our results demonstrate significant growth differences between the CX strain selected for growth on a plant protein-based diet using 40% SBM and current commercial strains. Callet *et al.*, (2021) also observed different levels of energy production in RBT fed on a plant-based diet with numerous genetic differences between the isogenic lines. Moreover, the CXS and CXA groups were the same strain, same cohort but only different in spawning age and showed significant differences in gene expression on the same diet at the same time points. Thus, age and timing of sampling needs further study and must be taken into consideration when doing comparative studies.

Acknowledgments

We would like to thank the hatchery staff, Tim Boyle and Julie Browning, at the Hagerman Fish Culture Experiment Station for their help with culturing fish. The work was funded by USDA, Hatch funds to MSP.

References

- Baeverfjord, G., & Krogdahl, A. (1996). Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: A comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases*, *19*(5), 375–387. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1996.d01-92.x>
- Balasubramanian, M. N., Panserat, S., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Montfort, J., Le Cam, A., Medale, F., Kaushik, S. J., & Geurden, I. (2016). Molecular pathways associated with the nutritional programming of plant-based diet acceptance in rainbow trout following an early feeding exposure. *BMC Genomics*, *17*(1), 449. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2804-1>
- Blaufuss, P. C., Bledsoe, J. W., Gaylord, T. G., Sealey, W. M., Overturf, K. E., & Powell, M. S. (2020). Selection on a plant-based diet reveals changes in oral tolerance, microbiota and growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) when fed a high soy diet. *Aquaculture*, *525*, 735287. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735287>
- Blaufuss, P. C., Gaylord, T. G., Sealey, W. M., & Powell, M. S. (2019). Effects of high-soy diet on S100 gene expression in liver and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, *86*, 764–771. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.025>
- Boucher, R. L., Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Kerneis, T., Goardon, L., Labbé, L., Chatain, B., Bothaire, M. J., Larroquet, L., Médale, F., & Quillet, E. (2012). Selection for Adaptation to Dietary Shifts: Towards Sustainable Breeding of Carnivorous Fish. *PLOS ONE*, *7*(9), e44898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044898>
- Burrells, C., Williams, P. D., Southgate, P. J., & Crampton, V. O. (1999). Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *72*(3), 277–288. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00143-9](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00143-9)
- Callet, T., Dupont-Nivet, M., Danion, M., Burel, C., Cluzeaud, M., Surget, A., Aguirre, P., Kerneis, T., Labbé, L., Panserat, S., Quillet, E., Geurden, I., Skiba-Cassy, S., & Médale, F. (2021). Why Do Some Rainbow Trout Genotypes Grow Better With a Complete Plant-Based Diet? Transcriptomic and Physiological Analyses on Three Isogenic Lines. *Frontiers in Physiology*, *12*, 732321. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.732321>
- Callet, T., Médale, F., Larroquet, L., Surget, A., Aguirre, P., Kerneis, T., Labbé, L., Quillet, E., Geurden, I., Skiba-Cassy, S., & Dupont-Nivet, M. (2017). Successful selection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on their ability to grow with a diet completely devoid of fishmeal and fish oil, and correlated changes in nutritional traits. *PLOS ONE*, *12*(10), e0186705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186705>
- Chen, W., Chang, K., Chen, J., Zhao, X., & Gao, S. (2021). Dietary sodium butyrate supplementation attenuates intestinal inflammatory response and improves gut microbiota composition in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed with a high soybean meal diet. *Fish Physiology and Biochemistry*, *47*(6), 1805–1819. <https://doi.org/10.1007/s10695-021-01004-w>
- Cheng, Z. J., Hardy, R. W., & Usry, J. L. (2003). Effects of lysine supplementation in plant protein-based diets on the performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and apparent digestibility coefficients of nutrients. *Aquaculture*, *215*(1), 255–265. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00166-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00166-7)
- Collins, S. A., Øverland, M., Skrede, A., & Drew, M. D. (2013). Effect of plant protein sources on growth rate in

- salmonids: Meta-analysis of dietary inclusion of soybean, pea and canola/rapeseed meals and protein concentrates. *Aquaculture*, 400–401, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.006>
- Council, N. R., Studies, D. on E. and L., Resources, B. on A. and N., & Shrimp, C. on the N. R. of F. and. (2011). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academies Press.
- Easy, R. H., & Ross, N. W. (2009). Changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) epidermal mucus protein composition profiles following infection with sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 4(3), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2009.02.001>
- FAO. (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018: Meeting the sustainable development goals*. FAO. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/I9540EN/>
- Gatlin, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E. J., Stone, D., Wilson, R., & Wurtele, E. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. *Aquaculture Research*, 38(6), 551–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>
- Geay, F., Ferraresso, S., Zambonino-Infante, J. L., Bargelloni, L., Quentel, C., Vandeputte, M., Kaushik, S., Cahu, C. L., & Mazurais, D. (2011). Effects of the total replacement of fish-based diet with plant-based diet on the hepatic transcriptome of two European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) half-sibfamilies showing different growth rates with the plant-based diet. *BMC Genomics*, 12(1), 522. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-522>
- Geurden, I., Borchert, P., Balasubramanian, M. N., Schrama, J. W., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Kaushik, S. J., Panserat, S., & Médale, F. (2013). The Positive Impact of the Early-Feeding of a Plant-Based Diet on Its Future Acceptance and Utilisation in Rainbow Trout. *PLOS ONE*, 8(12), e83162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083162>
- Gregório, S. F., & Fuentes, J. (2018). Regulation of Bicarbonate Secretion in Marine Fish Intestine by the Calcium-Sensing Receptor. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1072. <https://doi.org/10.3390/ijms19041072>
- Hoseinifar, S. H., Yousefi, S., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F., & Carnevali, O. (2021). Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Fish: The Implications of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotics. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(2), 198–217. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1795616>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Karsi, A., Cao, D., Li, P., Patterson, A., Kocabas, A., Feng, J., Ju, Z., Mickett, K. D., & Liu, Z. (2002). Transcriptome analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): Initial analysis of gene expression and microsatellite-containing cDNAs in the skin. *Gene*, 285(1), 157–168. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00414-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00414-6)
- Knudsen, D., Urán, P., Arnous, A., Koppe, W., & Frøkiær, H. (2007). Saponin-Containing Subfractions of Soybean Molasses Induce Enteritis in the Distal Intestine of Atlantic Salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2261–2267. <https://doi.org/10.1021/jf0626967>
- Kokou, F., Sarropoulou, E., Cotou, E., Rigos, G., Henry, M., Alexis, M., & Kentouri, M. (2015). Effects of Fish Meal

- Replacement by a Soybean Protein on Growth, Histology, Selected Immune and Oxidative Status Markers of Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46(2), 115–128. <https://doi.org/10.1111/jwas.12181>
- Krogdahl, Å., Gajardo, K., Kortner, T. M., Penn, M., Gu, M., Berge, G. M., & Bakke, A. M. (2015). Soya Saponins Induce Enteritis in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15), 3887–3902. <https://doi.org/10.1021/jf506242t>
- Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., & Bakke, A. M. (2010). Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: An update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*, 41(3), 333–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Livingstone, D. R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Médecine Vétérinaire (France)*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Oxidative+stress+in+aquatic+organisms+in+relation+to+pollution+and+aquaculture&author=Livingstone%2C+D.R.+%28%28Plymouth+Marine+Laboratory+%28Royau+me+Uni%29%29%29&publication_year=2003
- Olsvik, P. a., Torstensen, B. e., Hemre, G.-I., Sanden, M., & Waagbø, R. (2011). Hepatic oxidative stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) transferred from a diet based on marine feed ingredients to a diet based on plant ingredients. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), e424–e436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00778.x>
- Overturf, K., Welker, T., Barrows, F., Towner, R., Schneider, R., & LaPatra, S. (2013). *Variation in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, to Biosynthesize Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid When Reared on Plant Oil Replacement Feeds*. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/595974>
- Panserat, S., Hortopan, G. A., Plagnes-Juan, E., Kolditz, C., Lansard, M., Skiba-Cassy, S., Esquerré, D., Geurden, I., Médale, F., Kaushik, S., & Corraze, G. (2009). Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture*, 294(1), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.05.013>
- Romarheim, O. H., Øverland, M., Mydland, L. T., Skrede, A., & Landsverk, T. (2011). Bacteria Grown on Natural Gas Prevent Soybean Meal-Induced Enteritis in Atlantic Salmon. *The Journal of Nutrition*, 141(1), 124–130. <https://doi.org/10.3945/jn.110.128900>
- Silva, P. F., McGurk, C., Knudsen, D. L., Adams, A., Thompson, K. D., & Bron, J. E. (2015). Histological evaluation of soya bean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Quantitative image analysis vs. semi-quantitative visual scoring. *Aquaculture*, 445, 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.04.002>
- Turchini, G. M., Ng, W.-K., & Tocher, D. R. (Eds.). (2010). *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781439808634>
- van der Oost, R., Beyers, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

- Venold, F. F., Penn, M. H., Krogh, A., & Overturf, K. (2012). Severity of soybean meal induced distal intestinal inflammation, enterocyte proliferation rate, and fatty acid binding protein (Fabp2) level differ between strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 364–365, 281–292. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.035>
- Zhang, J.-X., Guo, L.-Y., Feng, L., Jiang, W.-D., Kuang, S.-Y., Liu, Y., Hu, K., Jiang, J., Li, S.-H., Tang, L., & Zhou, X.-Q. (2013). Soybean β -Conglycinin Induces Inflammation and Oxidation and Causes Dysfunction of Intestinal Digestion and Absorption in Fish. *PLOS ONE*, 8(3), e58115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058115>

Nutrigenomic Approaches Improve the Efficiency of Soybean Meal Utilization in Salmonids Aquaculture

Vikas Kumar*, Kenneth Overturf, and Kimia Kajbaf

Aquaculture Research Institute, Department of Animal, Veterinary and Food Sciences,
University of Idaho (UofI), Moscow, ID 83844, USA

E-mail: Vikaskumar@uidaho.edu

Abstract

The USDA ARS and UofI have developed several rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lines that show higher growth rates when fed an all-plant protein diet than non-selected lines of trout fed the plant protein diet or a fishmeal-based diet. So far, no commercial breeding programs has yet started to improve feed utilization efficiency in fish, mainly because of the difficulty in accurately measuring individual feed intake of fish reared in groups. Using these selected lines we proposed to test if feed conversion ratio (FCR) and body weight variations during successive periods of feed deprivation (FD) and re-feeding (RF) are correlated using a compensatory feeding regime. The goal of this study was to determine if indirect selection for the above traits could be used to develop alternative criteria to improve feed intake of the plant-based fed selected strain.

We began with 1600 fish (av. Int. wt. 30 g) from 12 families of the selected line, fed the plant protein diet (50% soy, protein: 41% and lipid: 20%). First, fish were tagged individually and reared in a common environment, they were then placed on feeding challenge regime for 4 months (one month each challenge either FD or RF), and performance were recorded. Thereafter, fish were separated into four groups (1331 fish) based on individual performance during FD and RF challenge study. FCR was recorded for 3 months in all four groups followed by measuring the stability of response to the FD and RF periods (2nd feeding challenge) which was the same as the 1st one. Out of 1331 fish, 143 fish exhibited a similar pattern of weight loss and gain, confirming the stability. As expected, the most efficient group was the FD-/RF+ (FCR=0.99) and the least efficient groups with FCR of ~1.4 were FD-/RF- and FD+/RF- (Figure 1A). Studying the gut microbiome of all four groups revealed that despite the variations dictated by FD and RF, the

bacterial community of FD-/RF+ group (best performers) shows more stability than the FD+/RF- (worst performers) throughout the feeding challenges (Figure 1B and 1C).

Conclusively, FCR improved more than 15% in best group (FD+/RF-) compared to the FD-/RF+ group which means utilizing these fish selected for improved feed efficiency will reduce soybean consumption and greatly decrease the feed cost for sustainable aquafeed industry.

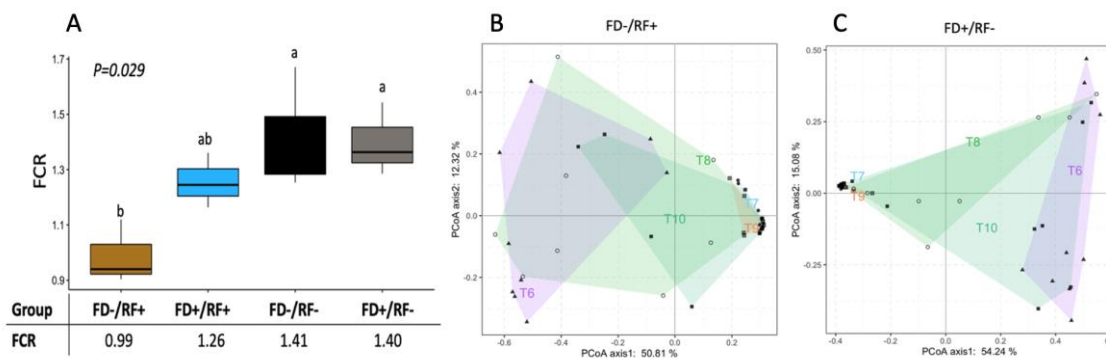


Figure 1: (A) Feed conversion ratio of rainbow trout based on their performance during the feeding challenge. (B and C) Microbiome variations of the best and worst performers during the second feeding challenge; T6: initial sampling, T7: 1st FD, T8: 1st RF, T9: 2nd FD, T10: 2nd RF

Keywords: *Salmonids, Aquaculture, Soybean meal*

Effect of Taurine Precursor on Growth and Taurine Content of Marine Fish

Yutaka Haga,¹ Kohei Nakamura,¹ Tomoko Ushigusa-Itoh,¹ Mojena Maria Gonzales-Plasus Gallo,^{1,2} Naoki Kabeya,¹ Shuichi Satoh.³

¹Department of Marine Biosciences, Tokyo University of Marine Science and Technology, 4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo, 108-8477, Japan

²College of Fisheries and Aquatic Sciences, Western Philippines University - Puerto Princesa Campus, Rafols Road, Pajara, Barangay Santa Monica, 5300 Puerto Princesa City, Palawan, Philippines.

³Faculty of Marine Science and Technology, Fukui Prefectural University, 1-1 Gakuencho, Obama, Fukui, 917-0003, Japan, e-mail: haga@kaiyodai.ac.jp

Abstract

Taurine is thought to be synthesized from methionine and cysteine by the cysteine sulfinic acid pathway in freshwater fish, but not in carnivorous marine fish. However, there are two biosynthetic pathways of taurine: cysteamine pathway and cysteic acid pathway. However, the synthesis via these two pathways has not been investigated by a feeding trial using these taurine precursors. We investigated possible taurine synthesis from these two pathways using freshwater fish (carp) and marine carnivorous fish such as red sea bream and Japanese flounder. As a result, it was found that taurine can be synthesized from the two pathways, and that cysteic acid has a higher potency of taurine accumulation than cysteamine. Also, there is a risk of occurrence of malformations in fish when fed excessive cysteamine in diet. Considering risk of having malformation in fish fed cysteamine, cysteic acid is a better choice as taurine precursor. We also examined effect of taurine supplementation to non-fishmeal diet on distal intestine of juvenile red sea bream. We observed that plant protein-based non-fishmeal diet caused lower growth, pathological changes of the intestine with high expression of cytokine genes of red sea bream but these changes can be ameliorated by taurine. This improvement was observed by 1-2% taurine which is beyond the requirement for red seabream estimated by growth study, suggesting that taurine supplementation is beneficial for fish fed plant-based diet in terms of ameliorating intestinal defects as well as preventing green liver syndrome in marine carnivorous fish. This paper also discusses possible inclusion of cysteamine and cysteic acid in feedstuffs, the possible mechanisms of amelioration of plant ingredient-induced intestinal damage by taurine, the response of taurine synthesizing enzyme gene expression to sulfur amino acid in fish, and new taurine source candidates for aquafeed.

Keywords: *Cysteine, Cysteamine, Cysteic acid, Soybean meal, Low fishmeal diet*

Introduction

Global demand for taurine is 49,000 tones, which is growing at 5-6% annually. There are two sources of taurine: naturally occurring taurine and synthetic taurine. The source of natural taurine includes fish, shellfish (octopus and squid) and cattle bile, but the availability of these ingredients are small, and the price is high. Bovine bile is utilized for isolating ursodeoxycholic acid, which is used for medication for liver, and the price of taurine, which is a by-product of ursodeoxycholic acid production is about one fourth to one fifth compared to that derived from fish and shellfish. However, since bile from 500-550 cattle is needed to produce 1 kg of natural taurine, production efficiency is not high. However, in Japan, only natural taurine is permitted to be used as a source of taurine for food material, it is an important taurine source for powdered milk for human. Taurine is contained in the protein source of the ingredient for fish feed. There are naturally occurring taurine and industrially produced synthetic taurine, and synthetic taurine is cheaper. Industrial manufacturing methods include ethanolamine esterification method and ethylene oxide method. In Japan, Taisho MTC Co. produces taurine by the ethanolamine esterification method, which supplies more than half of the domestic market share of 1200 tons in Japan. The ethylene oxide method has several advantages, but it also has the disadvantage of high cost of plant construction. In the world, Yangnong Pharmaceutical Co Ltd of China, which developed the ethylene oxide method, has a market share of more than 50%.

Taurine is metabolically synthesized from methionine and cysteine, so these compounds are important precursors of taurine. In addition, methionine serves not only a start codon for initiation of gene expression, but taurine also contributes to the stabilization of translation (Asano *et al.*, 2018). Taurine is abundant in animal-derived meals, ranging from 90 mg/kg of black soldier fly (BSF) meal to 10 g/kg of fishmeal. In addition, the taurine content of fish meal is 4-10 g/kg, which is about twice higher/lower depending on the type of the fishmeal. On the other hand, taurine is not contained in plant ingredients such as *Spirulina*, soybean meal (SBM) and soy protein concentrate (SPC) at all (Li and Wu, 2020). However, as a sulfur-containing amino acid, *Spirulina* contains 20 g/kg methionine, which is comparable to fish meal (Li and Wu, 2020). In addition, although SBM has a low content of methionine and cysteine, the content of those in SPC is about twice higher, and the sum of methionine and cysteine in the SPC is comparable to that of fish meal (Li and Wu, 2020). Furthermore, methionine is metabolized to glutathione in animals and is thought to contribute to control redox status. Small amount of glutathione is contained in the feed

stuffs, and its levels in the SBM, SPC, and BSF meal exceeds that in the fish meal (Li and Wu, 2020).

As described above, fish meal is rich in taurine, but not in plant ingredients, that are the main alternatives of fishmeal in aquafeed. Therefore, fish species that can synthesize taurine from methionine and cysteine does not require taurine in the diet but when they lack endogenous synthetic ability, it requires taurine in the diet, thus, taurine is considered as a conditional essential nutrient in fish. Taurine involves in various physiological processes such as growth, vision, reproduction, neurotransmission, osmoregulation, and antioxidant activity (Takeuchi 2014). Taurine is known to control liver function, bile acid conjugation and thus lipid absorption, and improve swimming behavior and early growth in fish (Salze and Davis, 2015). Taurine is not protein bound amino acid but is abundantly found as an extractive component of fish and shellfish.

Taurine requirement in fish

Recently, Li *et al.* (2022) investigated 292 out of 396 published studies and found that taurine requirements are affected by taurine content in the basal diet, and their meta-analysis shows that marine fish requires higher dietary taurine than freshwater fish. It was suggested that the addition of taurine had a high effect of improving growth, and that the average requirement in diet was estimated as 0.79%. This is well agreement with improved carbohydrate synthesis when tilapia fed with 0.8% taurine supplemented diet (Shen *et al.*, 2021). It was suggested that the addition of taurine would improve FCR in all categories of animal species investigated (all fish species, marine and freshwater fish, shrimp, reptiles, animals at low/mid/high trophic levels). Regarding PER, it was suggested that there was no major impact on low trophic level species, shrimp and freshwater fish, but for mid and high trophic level species and marine fish, significant improvement was expected by the addition of taurine.

Rainbow trout, which can synthesize taurine in the body, are fed a fishmeal-free diet supplemented with methionine and reared for 12 weeks and show normal growth that is comparable to that of a fishmeal-based diet (Fig.2; Watanabe *et al.*, 1997). In yellowtail, feeding of fishmeal-free diet showed no growth retardation within 8 weeks but sudden stop of growth afterwards (Fig.2; Watanabe *et al.*, 1998). Examining taurine requirement of yellowtail by supplementing taurine to low fishmeal diet containing 20-30% fishmeal, it was found that additional taurine was not required for a diet containing 30% fishmeal (Tochino *et al.*, 2009). It was suggested that 0.5% taurine should

be supplemented to the diet formulated in a diet containing below 20% fishmeal (Tochino *et al.*, 2009). Yellowtail is a relatively fast-growing fish species but it required for more than 8 weeks to observe growth degradation due to taurine deficiency (Fig.2; Watanabe *et al.*, 1998). This implies that a 12-week feeding trial is recommended when one studying taurine requirements of marine carnivorous species by evaluating growth performance. It has also been demonstrated that red sea bream requires 0.5% taurine for normal growth by taurine supplementation to the casein-based diet (Matsunari *et al.*, 2008). However, ameliorating effect of taurine on soybean meal-induced enteritis has been recognized when surplus level of taurine was supplied which is beyond requirement of red sea bream estimated by growth study (Li *et al.*, 2019). With the increasing number of the certification in the aquaculture industry such as Aquaculture Stewardship Council, the use of marine products in aquafeed have been decreasing and the use of terrestrial plant ingredients has been increasing. Thus, further study is needed to clarify taurine requirement which is needed to treat intestinal damage in fish fed plant-based diet.

Taurine synthesis in animals

Taurine is synthesized from methionine and cysteine in animals (Fig.1). Methionine is first converted to cystathionine via homocysteine, and cystathionine is converted to cysteine by cystathionine gamma lyase (CSE)(Fig.1). Taurine is synthesized by either the cysteamine pathway, the cysteine sulfinic acid pathway or the cysteic acid pathway. Cysteine is oxidized to cysteine sulfinic acid by cysteine dioxygenase (CDO) and then decarboxylated to hypotaurine by cysteine sulfinic acid decarboxylase (CSD)(Fig.1). The origin of cysteic acid differs depending on the species, and it is synthesized from cysteine in mollusks but from sulfate in chickens and algae, but details are unclear (Nakamura *et al.*, 2021 and references there in). On the other hand, cysteamine is thought to be derived with the degradation of coenzyme A (Dominy *et al.*, 2007).

In the cysteine sulfinic acid pathway, the rate-limiting step is where hypotaurine production from cysteine sulfinic acid which is catalyzed by CSD (Fig.1). It is well established that cat cannot synthesized taurine because it lacks CSD activity (Huxtable 1992). So, cat requires dietary taurine as an indispensable nutrient. It was demonstrated that administration of cysteine sulfinic acid, which is a substrate for CSD, into the blood does not increase taurine in cat (Edger *et al.*, 1994).

Cysteine is also important for taurine synthesis because it has biological activity as a precursor of cysteine sulfinic acid (Fig.1). Cysteine possesses a thiol group and is highly reactive nature. So, it shows cytotoxicity when it is in excess, and is also known to be converted to coenzyme A and glutathione. CDO requires Fe^{2+} for its maximum activity and plays a role in converting toxic cysteine into more polar compounds such as cysteine sulfinic acid, etc. (Dominy *et al.*, 2007). It is assumed that CDO determines the amount of taurine synthesis in rainbow trout, which has relatively high CSD activity and can synthesize taurine from methionine in the body (Wang *et al.*, 2016).

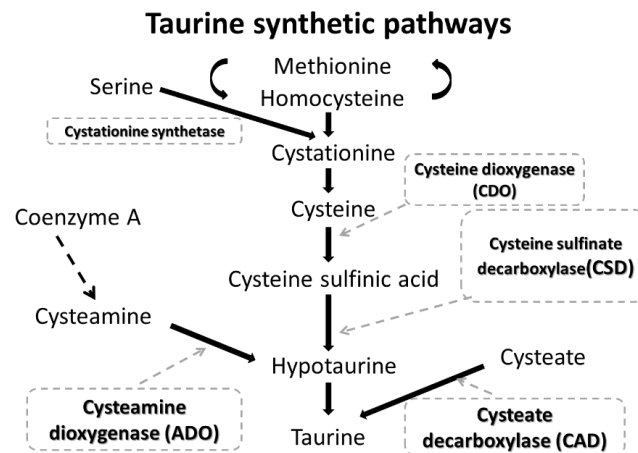


Fig.1. Taurine biosynthesis pathway in animals

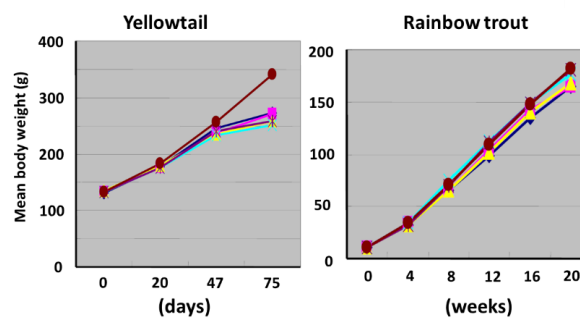


Fig.2. Yellowtail *Seriola quinqueradiata* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* juveniles fed fishmeal free diets supplemented with crystalline amino acid mixture. Growth retardation of yellowtail was noted after 8 weeks onward when fed fishmeal free diets. Details are described in Watanabe *et al.* (1997 and 1998)

On the other hand, Japanese flounder lacks CSD activity but has high CDO activity (Wang *et al.*, 2016). Thus, it seems that the ability to synthesize cysteine sulfinic acid is high in this species. However, flounder cannot synthesize taurine from the cysteine sulfinic acid pathway due to its low CSD activity (Goto *et al.*, 2002; Haga *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). In previous reports, bluegill has the highest CSD activity in fish, followed by red tilapia and tiger puffer (Goto *et al.*, 2002; Divakaran *et al.*, 1992). It has also been suggested that seabass also has high CSD activity (Zhang *et al.*, 2019). Other reports have shown no CSD activity in higher predators such as chub mackerel, yellowtail, tuna, bonito, and dolphin fish *Coryphaena hippurus* (Divakaran *et al.*, 1992; Jacobsen and Smith 1968; Yokoyama *et al.*, 2001). From the above, it was hypothesized that carnivorous fish species lacks the ability to synthesize taurine by the cysteine sulfinic acid pathway.

Fan *et al.* (2018) reported CDO activities in two species of mollusks, two species of crustaceans, and three teleosts. Xhang *et al.* (2019) reported CSD activities in five mollusks, one squid, and three teleosts. Unfortunately, unit of activity is unclear and thus hinders comparison of the activities reported in other studies. Also, only common name in Chinese was provided but not scientific names of the species examined in their study. However, these studies suggested presence of cysteine sulfinic acid pathway in seabass. Also, all species in mollusks and crustacean such as *Litopenaeus vannamei* examined, CDO activities are found in muscle but not in intestine and midgut gland/liver (Fan *et al.*, 2018). Also, among five mollusks examined, no species have CSD activity in intestine, gill and midgut gland/liver but three of them have the activity in the muscle (Xhang *et al.*, 2019). Likewise, very limited study has been done for invertebrates but CDO and CSD activities in mollusks are tended to be found in muscle but not in the midgut gland. Although invertebrates have a high taurine content, research has not progressed, but CSD activity has recently been reported from two species of squids such as *Heteroloigo bleekeri* and *Uroteuthis edulis*, suggesting that at least these squids can synthesize taurine (Matsumoto *et al.*, 2021).

Taurine content in fish administered taurine precursor

0.25 mM, 0.5 mM and 1 mM cysteamine or L-cysteine were injected intraperitoneally to carp at 1 mL / 100 g body weight and the taurine content in plasma and hepatopancreas after 2-24 hours was examined (Gonzales, 2018). As a result, in the L-cysteine injection group, the taurine level in the blood reached the highest level 2 or 4 hours after the injection, and then decreased. On the other hand, in the cysteamine injection group, the taurine level in the blood reached the highest

level after 6-12 hours and then decreased. The taurine content in the hepatopancreas did not increase in the L-cysteine injection group, but in the cysteamine injection group, the taurine content in the hepatopancreas increased 24 hours after the injection (Gonzales, 2018). In addition, when cysteamine HCL, methionine, and cysteine-supplemented diet were given to carp, the taurine content in fish body increased, and the level was higher in fish fed the cysteamine HCL supplemented diet than those fed the other precursors supplemented diets. These results suggest that carp can synthesize taurine by the cysteamine pathway and that cysteamine has a higher potency as a taurine precursor than cysteine (Gonzales-Plasus *et al.*, 20019). Our study also showed that taurine could be synthesized by the cysteine sulfinic acid pathway in carp since serum taurine level increased in fish injected with cysteine, but the synthesized taurine was not accumulated in the hepatopancreas, suggesting that the mode of taurine accumulation differs depending on the synthetic pathway (Table 1).

In addition, when Japanese flounder was fed a taurine-deficient diet containing 0.25, 0.5, and 1.0% cysteic acid for 30 days, the percent weight gain and specific growth rate in the 0.25-0.5% cysteic acid supplemented groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$, Nakamura *et al.*, 2021). With this increased growth, feed efficiency was tended to be improved in fish fed cysteic acid supplemented diet (Nakamura *et al.*, 2021). In addition, the expression level of *igf-1* in the liver was significantly higher in the 1.0% cysteic acid supplemented group than the control group ($P < 0.05$, Nakamura *et al.*, 2021). In addition, the taurine content of the liver and whole fish increased linearly as supplemental cysteic acid level increased in the diets (Nakamura *et al.*, 2021), strongly suggesting that taurine is synthesized from cysteic acid in Japanese flounder (Table 1).

CSD have also been reported to involved in the cysteic acid pathway in red sea bream (Goto *et al.*, 2003). However, these reports were based on a short-term study using cultured hepatopancreas, and there was no study examining how much taurine was accumulated by feeding diets supplemented with cysteic acid and cysteamine to red sea bream. Therefore, we examined the accumulation of taurine in the red sea bream fed 0.5% cysteic acid, and cysteamine to red sea bream (Itoh *et al.*, 2019). As a result, the growth of the fish fed with the diet supplemented with cysteic acid was higher and an increased taurine content was observed (Itoh *et al.*, 2019). Interestingly, increased taurine level in serum was observed in red sea bream injected cysteamine (Itoh *et al.*, 2018), no taurine deposition was observed in red sea bream fed 0.5% cyteamine supplemented diet

(Itoh *et al.*, 2019). These reports suggest that fish can synthesize taurine from cysteamine and cysteic acid pathways but taurine deposition in liver is different depending on the synthetic pathways (Table 1).

Table 1. Taurine content in fish administered taurine precursors

Table 1. Taurine content in fish administered taurine precursors					
Compounds	Delivery method	Speceis	Feeding habits	Taurine content	References
Cysteamine-HCL	Feeding	Carp	Omni/hervivorous	Increased in liver	Gonzales-Plasus et al. 2019
Cysteamine	Feeding	Carp	Omni/hervivorous	Increased in liver	Gonzales-Plasus et al. 2019
L-cysteine	Intraperitoneal injection	Carp	Omni/hervivorous	Increased in serum	Gonzales MMG. 2018
Cysteamine	Intraperitoneal injection	Carp	Omni/hervivorous	Increased in liver and serum	Gonzales MMG. 2018
Cysteic acid	Feeding	Japanese flounder	Carnivorous	Increased in liver and whole body	Nakamura et al. 2021
Cysteic acid	Feeding	Red sea bream	Carnivorous	Increased in liver	Itoh et al. 2019
Cysteamine	Feeding	Red sea bream	Carnivorous		Itoh et al. 2019
L-cysteine	Feeding	Red sea bream	Carnivorous		Itoh et al. 2019
Cysteic acid	Intraperitoneal injection	Red sea bream	Carnivorous	Increased in liver and serum	Itoh et al. 2018
Cysteamine	Intraperitoneal injection	Red sea bream	Carnivorous	Increased in serum	Itoh et al. 2018
L-cysteine	Intraperitoneal injection	Red sea bream	Carnivorous		Itoh et al. 2018

It has been reported that in rats, dietary keratin can be source of cysteic acid. It was then converted into taurine in liver of the rat fed casein and keratin mixture (Wolber *et al.*, 2016). It is well known that cats cannot synthesize taurine from the cysteine sulfinic acid pathway (Huxtable, 1992). However, it has been suggested that taurine cannot be synthesized by cysteine sulfinic acid in cat, an obligate carnivore, but it can convert cysteic acid into taurine (Edger *et al.*, 1998). Considering that red sea bream and Japanese flounder are carnivorous fish, it may be possible to synthesize taurine to some extent by the cysteic acid pathway in carnivorous fish which are located at higher trophic level in the food web. We also observed that toxicity of excessive cysteamine such as hemorrhage of base of caudal fin and dorsal vending in common carp and abnormal gill cover in Japanese flounder (Gonzales-Plasus *et al.*, 2019; Nakamura *et al.*, 2019), suggesting toxicity of cysteamine for fish. In contrast, we did not observe such kind of morphological abnormality in fish fed cysteic acid supplemented diet. This probably due to high water solubility of cysteic acid. Thus, considering low risk of toxicity of cysteic acid, it can be better source of taurine.

Other taurine sources

Our studies have shown that cysteamine and cysteic acid can be sources of taurine. It will be of interest to the reader how much of these compounds are contained in the feed material. As for cysteamine, cysteamine preparations are sold for chickens, pigs, and fish feeds because they can be expected to have an enhancing effect by inhibiting the action of somatostatin, which suppresses growth hormone. On the other hand, cysteamine is a thiol compound, and when it becomes excessive due to its high reactivity, it causes a physiological disorder characterized by damage to the digestive tract. Therefore, although it is also commercially used as a fish additive, its use in animal feed is prohibited in the United States, Canada, Malaysia and Thailand (Huynh *et al.* 2018). Cysteamine, seems to be used as a premix with other additives for aquafeed, has also been suggested to react with vitamin K in the premix (Huynh *et al.* 2018). In Vietnam, about 30 mg/kg of cysteamine is mixed in two types of commercially available supplements, and 23-51 mg/kg of cysteamine is also detected in three types of commercially available feed (Huynh *et al.* 2018). On the other hand, cysteamine is also produced during fishmeal processing, and higher cysteamine was detected in the meal produced from fish preserved for 7 days than that from fresh fish (Tozawa and Kawabata 1987). It is a matter of concern whether these cysteamines become

taurine precursors and meet the taurine requirements of fish. It is reported that increased taurine was observed in carp fed a diet with 10 g/kg cysteamine. Compared to this value, cysteamine generated in the fishmeal manufacturing process and detected in Vietnamese feed are about one-thousandth and one fortieth to one twentieth lower. Therefore, it is unlikely that trace amounts of cysteamine contained in such commercial feed items and feed ingredients are a source of taurine.

Marine products have higher sulfur-containing amino acids than terrestrial animals, and both cysteamine and cysteic acid can be produced by oxidation of cysteine. In addition, cysteine is abundant in skin keratin and is abundant in feather meal. In fact, it has also been reported that lanthionine contained in feather meals is decomposed into cysteic acid by acid hydrolysis (Latshaw 1990). Then, is there a possibility that cysteic acid etc. will be generated due to oxidation during storage of these feed ingredients? So we looked at the cysteic acid content in feather meal, fishmeal and SBM. As a result, cysteic acid was the highest in fish meal, the lowest in SBM, and feather meal was an intermediate value, which was considered to reflect the content of sulfur-containing amino acids in feed ingredients and their susceptibility to oxidation. The content was 0.25 g/kg (fish meal), 0.1 g/kg or less for defatted soybean meal, and 0.15 g/kg or less for feather meal. In red sea bream, 1 g/kg of cysteic acid promoted growth (Itoh *et al.*, 2019), and in Japanese flounder, 2.5-5.0 g/kg of cysteic acid promoted growth (Nakamura *et al.*, 2021), the content was about 1/10, and it was found that it is unlikely that existing feed ingredients would supply enough cysteic acid to promote growth.

Red algae are also rich in taurine. In red algae, *Gelidiaceae* and *Gracilaria* are widely produced as natural agar source. Aquaculture production of aquatic products is increasing worldwide, but red algae are second highest at 18 million tons, and their production has been increasing rapidly since 2000. Red algae contain phycoerythrin, which is a red pigment not found in green algae and land plants, so that green light in water can be used for photosynthesis. *Gelidiaceae* is a popular natural source of agar, and in Japan, so-called nori (*Porphyra yezoensis*) is also one of the very popular food (Fig.3). Among the seaweeds, the taurine content of *Colpomenia sinuosa* and *Gliopeltis* is as high as about 650 mg/100 g, and the content fluctuates from 90 to 350 mg/100 g in *Gliopeltis* depending on the place of collection (Kawasaki *et al.*, 2017). The physiological significance of taurine in red algae is unknown, but it could be used for osmoregulation since it grows a little deeper water than green algae. It was suggested that inclusion of taurine-rich red algae has a beneficial effect on Atlantic salmon (Lozano *et al.*, 2016).

Since taurine is rarely detected in processed products from red algae-derived agar, agar cannot be used as a source of taurine (Kawasaki *et al.*, 2017). Since the natural agar source such as gelidiaceae is repeatedly washed with running water until the color changes, it is presumed that water-soluble taurine is lost in these washing steps (Kawasaki *et al.*, 2017).

Nopal cactus is widely distributed in the warm arid zones of Central and South America, South Africa, and the Mediterranean coast, and the fruit of the cactus contains 15 g of taurine per 100 g of protein (El-Mostafa *et al.*, 2014; Fig.3). It is suggested that the taurine content varies depending on the color of the fruit and is abundant in the orange one (Horibe *et al.*, 2020). When the above taurine content was calculated per dry weight, it was about 7 g per kg, which was comparable to fish meal. Nopal cactus fruit is rich in polysaccharides in addition to taurine, and its addition effect is also expected. In addition, nopal cactus is a CAM plant adapted to the harsh habitat of arid zones and accumulates malic acid at night. Therefore, it seems that it has a pathway to metabolize this malic acid to taurine like the above-mentioned zebrafish (Yang *et al.*, 2020). So far, there is no information on taurine synthesis from malic acid except case of zebrafish, but it is expected that the stems of nopal cactus could be a source of malic acid for fish species that can convert it into taurine. It is also expected that processed residues from cactus fruits could be used as a source of taurine for aquafeed.

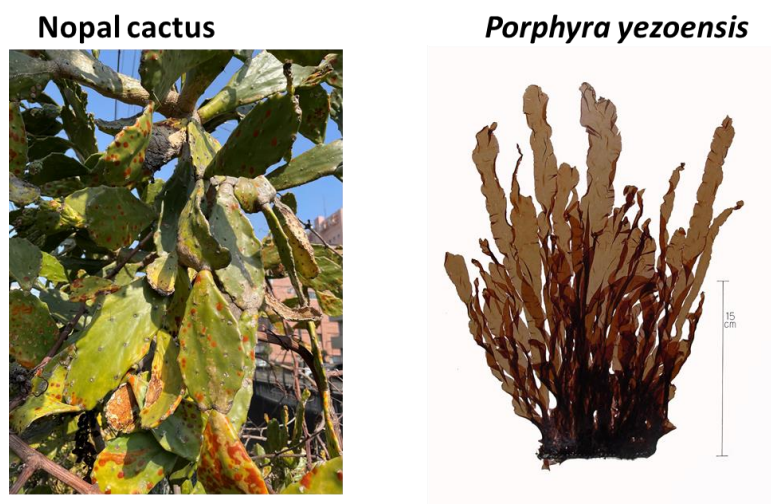


Fig. 3 New taurine source candidates for aquafeed. Nopal cactus contains high taurine in its fruit. Red algae also known to contain high taurine. A picture of *Porphyra* is kindly provided by Dr. Kyosuke Niwa, Tokyo University of Marine Science and Technology.

The plant-based protein source is undoubtedly a promising ingredient for fish diet because of its high production volume and low price, but it contains almost no taurine. Soybean meal and soy saponin flatten the intestinal mucosal fold of the distal intestine of Atlantic salmon and trout, less absorptive vacuoles, expansion of lamina propria, with neutrophil infiltration (Baeverfjord and Krogdahl, 1996; Bakke-McKellep *et al.*, 2000, 2007; Li *et al.*, 2019). In recent years, the effects of soybean meal on the intestinal tract of marine carnivorous fish such as red sea bream and Japanese flounder have also been reported. The effectiveness of taurine on liver function and green liver disease in red sea bream has been investigated so far, but most of the studies focus on liver function but few of them studied effect of taurine on distal intestine. Therefore, we studied effect of taurine supplementation on non-fishmeal diet formulated with plant protein sources and examine morphological changes of intestine of red sea bream.

1-2% of taurine was added to a diet in which fish meal was replaced with plant ingredients, and the growth performance, the tissue morphology of the intestine, and the expression of cytokine genes were examined in red sea bream. As a result, the weight gain was significantly lower in fish fed the fishmeal-free diet than in the control diet ($P < 0.05$), but it tended to improve with increasing supplemental taurine in diet (Li *et al.*, 2019). Similarly, the specific growth rate was improved by taurine supplementation. Further, 2% taurine improved the feed conversion efficiency to the extent that there was no significant difference from the control group (Li *et al.*, 2019). The apparent digestibility coefficient of crude protein and fat was significantly inferior to that of the control group when supplemented 1% taurine in non-fishmeal diet but was not significantly different from that of the control group when more than 1.5% of taurine was supplemented (Li *et al.*, 2019). In the 1% supplemented group, infiltration of neutrophils was observed in the submucosal layer together with inflammation in the intestine, but it was ameliorated by further increasing taurine supplementation level in the diet, and the expression level of cytokine gene was also significantly reduced in fish with the addition of taurine (Li *et al.*, 2019). In this study, it was speculated that more than 1% of taurine in the diet was required to ameliorate intestinal damage caused by soybean meal, which exceeds the requirement estimated based on the growth of red sea bream (Matsunari *et al.*, 2008). Presumably, recovery from the pathological symptom of intestinal injury requires more taurine than that required to support normal fish growth.

The mechanism by which taurine ameliorates intestinal damage caused by soybean meal is unknown, but taurine regulates the osmotic pressure of intestinal cells as an osmotic substance

and improves the apparent digestive absorption rate by assisting the absorption of nutrients. May have prompted. In addition, improving the suppression of lipid absorption due to taurine deficiency by promoting bile acid synthesis is also considered to be one of the factors contributing to the improvement of the digestive absorption rate of lipids. Recently, taurine has been reported to improve bacterial mortality by promoting nitric oxide and reactive oxygen species synthesis in the intestine of zebrafish (Yang *et al.* 2020). Furthermore, it has been suggested that when bile acid synthesis is promoted in mammals, taurine in bile acids secreted into the intestinal tract is decomposed by intestinal bacteria, and the resulting toxicity of sulfate gas reduces intestinal pathogens. (Stacey *et al.* 2021). It has also been reported that this effect can be reproduced by oral administration of taurine. In fish as well, it is worthwhile to compare the intestinal bacterial flora of fish fed the plant-based diet with or without taurine and examine whether it can be improved by taurine addition.

Gene expression of taurine metabolizing enzymes

The expression of the taurine synthase gene (CSD, ADO, CDO) in Asian sea bass is suppressed by the taurine content in the feed (Poppi *et al.*, 2020). It has also been suggested that this species is affected not by sulfur-containing amino acids but by food intake itself (Poppi *et al.*, 2019). Expression of the taurine synthase gene (CSD, and CDO) in tiger puffer is suppressed by the taurine content in the diet (Wei *et al.*, 2020). However, the taurine content in plasma, muscle, and liver did not significantly decrease in taurine deficiency, suggesting that this species was able to synthesize taurine (Wei *et al.*, 2020). This is consistent with the highest CSD activity of tiger puffer fish examined in Yokoyama *et al.* 2001. In rainbow trout, tiger puffer, and Asian sea bass, CSD activity is high, and when the feed contains sufficient methionine and cysteine, taurine is synthesized by the cysteine sulfinic acid pathway. Ingestion of taurine in these fish species seems to reduce the expression of *cdo*, reduce the amount of taurine synthesis in the body, and maintain the amount of taurine in the body. On the other hand, although the reason is unknown, ingestion of taurine reduces the activity of CSD in fish with originally low CSD activity such as Japanese flounder and turbot. In Japanese flounder, the expression level of *cdo* is twice as high as that of rainbow trout, and the ability to produce cysteine sulfinic acid is high (Wang *et al.*, 2016). Considering that cysteic acid can be synthesized in animals by oxidation of cysteine sulfinic acid, it can be said that high CDO activity has a high ability to synthesize a precursor of cysteic acid in

the cysteic acid pathway. The high ability to synthesize cysteic acid precursors may be indirect evidence that flounder makes effective use of the cysteic acid pathway.

Measurement of enzyme activity

Goto *et al.* (2021) reevaluated the optimum conditions for CDO activity in the liver of bluegill, and found that the optimum condition for bluegill CDO was slightly different from that reported in mammals, such as temperature, the type of buffer solution and the concentration of Fe ions, etc. They also suggested that optimizing conditions enabled to detect approximately twice higher CDO activity than those measured under optimal conditions for mammalian CDO (Goto *et al.*, 2021). However, most of the enzyme activity of taurine synthesis in fish reported seemed to be measured under optimal condition established for mammals. For example, it was considered that the CSD activity of rainbow trout was about 1/3 of that of mice, but CSD activity of rainbow trout should be re-evaluated under optimal condition for fish enzyme.

Since an analytical kit using the ELIZA method for examining the activity of CSD in fish are commercially available in China, this is a great advantage for studying taurine synthesizing enzyme activity in fishes. Currently, relatively less effort was paid for studying taurine synthetic ability in omni-herbivorous freshwater fish. Although we have the largest production of freshwater fishes among fisheries production in the world, dietary taurine requirement of freshwater fishes seems to be lower than that of marine species, which is presumed to reduce the motivation to study taurine requirement of freshwater fishes. Even in the results of the meta-analysis by Li *et al.* (2022), there is a wide range of taurine requirement of shrimp and freshwater fish species, and it has to be studied in more detail. On the other hand, the production of capture fisheries is mainly occupied by marine fish, and it is presumed that many of them require taurine. Thus, further study is needed to determine taurine requirement of these target species of marine aquaculture.

References

- Asano K, Suzuki T, Saito A, Wei F-Y, Ikeuchi Y, Numata T, Tanaka R, Yamane Y, Yamamoto T, Goto T, Kishita Y, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, Tomizawa T, Sakaguchi Y, Suzuki S. 2018. Metabolic and chemical regulation of tRNA modification associated with taurine deficiency and human disease. *Nucleic Acids Research* 46, 1565–1583, <https://doi.org/10.1093/nar/gky068>
- Baeverfjord G, Krogdahl Å. 1996. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of the Fish Diseases* 19, 375-387.
- Bakke-McKellep CM, Baeverfjord PG, Krogdahl Å, Landsverk T. 2000. Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with soybean meal-induced enteritis. *Journal of the Fish Diseases* 23, 115-127.
- Divakaran S, Ramanathan S, Ostrowski AC. 1992. Endogenous production of taurine in two teleost fish: *Coryphaena hippurus* and red hybrid tilapia. *Comparative Biochemistry and Physiology* 101B, 321–322.
- Dominy JE, Simmons CR, Hirschberger LH, Hwang J, Coloso RM, Stipanuk MH. 2007. Discovery and characterization of a second mammalian thiol dioxygenase, cysteamine dioxygenase. *Journal of the Biological Chemistry* 282, 25189-25198.
- Edgar SE, Hickman MA, Marsden MM, Morris JG, Rogers QR. 1994. Dietary cysteic acid serves as a precursor of taurine for cats. *Journal of Nutrition* 124, 103–109.
- Edgar SE, Kirk CA, Rogers QR, Morris JG. 1998. Taurine status in cats is not maintained by dietary cysteinesulfonic acid. *Journal of Nutrition* 128, 751–757.
- El-Mostafa K, El Kharrassi Y, Badreddine A, Andreoletti P, Vamecq J, El Kebbaj MS, Latruffe N, Lizard G, Nasser B, Cherkaoui-Malki M. 2014. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules* 19, 14879-14901.
- Fan Z, Hu J, Jiang R, Yang X, Jin X. 2018. Evaluation of cysteine dioxygenase activity in marine organisms by high performance liquid chromatography. *Food Science* 39, 174-178 (in Chinese with English abstract).
- Gonzales MMG. 2018. Basic studies on taurine synthesizing ability and its synthetic pathways in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and common carp *Cyprinus carpio*. Ph D thesis, Tokyo University of Marine Science and Technology.
- Gonzales-Plasus MM, Kondo H, Hirono I, Satoh S, Haga Y. 2019. Cysteamine dioxygenase as enzymes for taurine synthesis and the negative effect of high dietary cysteamine on growth and body shape of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture Science* 67, 95-108.
- Goto T, Matsumoto T, Murakami S, Takagi S, Hasumi F. 2003. Conversion of cysteate into taurine in liver of fish. *Fisheries Science* 69, 216–218.
- Goto T, Mochizuki A, Hasumi F. 2002. Distribution and activities of enzymes involved in taurine biosynthesis in liver of fish. *Aquaculture Science* 50, 443–449.

- Goto T, Ooya K, Yamamoto S, Onoda K, Kobayashi T, Imai K. 2021. Characterization of cysteine dioxygenase in the liver of bluegill *Lepomis macrochirus* for the determination of enzyme activity. *Aquaculture Science* 69, 299-305.
- Haga Y, Kondo H, Kumagai A, Satoh N, Hirono I, Satoh S .2015. Isolation, molecular characterization of cysteine sulfenic acid decarboxylase (CSD) of red sea bream *Pagrus major* and yellowtail *Seriola quinqueradiata* and expression analysis of CSD from several marine fish species. *Aquaculture* 449, 8–17.
- Horibe, T., Sumi, H., Teranobu, R. 2020. Zinc biofortification of the edible cactus *nopalea cochenillifera* grown under hydroponic conditions. *Environmental Control in Biology* 58, 43-47.
- Huxtable RJ .1992. Physiological actions of taurine. *Physiological Review* 72. 101–163.
- Huynh PTN, Nguyen PH, Nguyen MA. 2018. Determination of cysteamine in animal feeds by high performance liquid chromatography with diode-array detection. *Science & Technology Development Journal*, 21, 37-43.
- Ito T, Cho JH, Nakamura K, Masuda R, Haga Y, Satoh S .2019. Sulfur amino acid metabolism and growth of juvenile red sea bream. *Japanese Journal of Taurine Research* 5, 32–33 (in Japanese).
- Itoh T, Haga Y, Kurihara A, Kondo H, Hirono I, Satoh S. Effects of intraperitoneal injection of sulfur compounds on taurine synthesis in juvenile red sea bream (*Pagrus major*). *International Symposium on Fish Nutrition and Feeding 2018*, Las Palmas, Spain.
- Jacobsen JG, Smith LH .1968. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiological Review* 48, 424–511.
- Kawasaki A, Ono A, Mizuta S, Kamiya M, Takenaga T, Murakami S. 2017. The taurine content of Japanese seaweed. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 975, 1105-1112.
- Latshaw JD. 1990. Quality of feather meal as affected by feather processing conditions. *Poultry Science* 69, 953-958.
- Li F, Haga Y, Kondo H, Hirono I, Satoh S. 2019. Effect of graded levels of taurine supplementation to non fishmeal diet on growth, nutrient digestibility, intestinal morphology and cytokine gene expression of juvenile red seabream *Pagrus major*. *Aquaculture Science* 67, 333-346. <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci.65.239>
- Li L, Liu H-Y, Xie S-Q, Zhang P-Y, Yang Z-C. 2022. Effects of taurine supplementation on growth performance and feed utilization in aquatic animals: A meta-analysis. *Aquaculture* 551, 737896, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737896>.
- Li P, Wu, G. 2020. Composition of amino acids and related nitrogenous nutrients in feedstuffs for animal diets. *Amino Acids* 52, 523–542, <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02833-4>
- Lozano I, Wacyk JM, Carrasco J, Cortez-San Martín MA. 2016. Red macroalgae *Pyropia columbina* and *Gracilaria chilensis*: sustainable feed additive in the *Salmo salar* diet and the evaluation of potential antiviral activity against infectious salmon anemia virus. *Journal of the Applied Phycology* 28, 1343–1351. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0648-8>
- Matsumoto T, Akita M, Ogawa M, Goto T. 2021. Evaluation of taurine biosynthesis in the livers of the spear squid *Heteroloigo bleekeri* and the swordtip squid *Uroteuthis edulis*. *Fisheries Science* 87, 717-725.

- Matsunari H, Furuita H, Yamamoto T, Kim S-K, Sakakura Y, Takeuchi T. 2008. Effect of dietary taurine and cystine on growth performance of juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture* 274, 142-147.
- Nakamura K, Gozales-Plasus MM, Itoh T, Masuda R, Haga Y, Satoh S. 2019. Growth and amino acid content in Japanese flounder ingested cysteamine. *Japanese Journal of Taurine Research* 5, 34-35.
- Nakamura K, Gozales-Plasus MM, Ushigusa-Itoh T, Masuda R, Kabeya N, Kondo H, Hirono I, Satoh S, Haga Y. 2021. Taurine synthesis via the cysteic acid pathway: effect of dietary cysteic acid on growth, body taurine content, and gene expression of taurine-synthesizing enzymes, growth hormone, and insulin-like growth factor 1 in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* 87, 353-363, <https://doi.org/10.1007/s12562-021-01500-1>
- Poppi DA, Moore SS, Wade NM, Glencross BD. 2019. Postprandial plasma free amino acid profile and hepatic gene expression in juvenile barramundi (*Lates calcarifer*) is more responsive to feed consumption than to dietary methionine inclusion. *Aquaculture* 501, 345-358. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.11.044
- Poppi DA, Moore SS, Wade NM, Glencross BD. 2020. Adequate supply of dietary taurine stimulates expression of molecular markers of growth and protein turnover in juvenile barramundi (*Lates calcarifer*). *Fish Physiology and Biochemistry* 46, 953-969. doi: 10.1007/s10695-020-00762-3
- Salze GP, Davis DA. 2015. Taurine: a critical nutrient for future fish feeds. *Aquaculture* 437, 215-229.
- Shen GP, Ding ZN, Dai T, Feng JH, Dong JY, Xia F, Xu JJ, Ye JD. 2021. Effect of dietary taurine supplementation on metabolome variation in plasma of Nile tilapia. *Animal* 15, 100167, <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100167>.
- Stacy A, Andrade-Oliveira V, McCulloch JA, Hild B, Oh J-H, Perez-Chaparro PJ, Sim CK, Lim AI, Link VM, Enamorado M, Trinchieri G, Segre JA, Rehermann B, Belkaid Y. 2021. Infection trains the host for microbiota-enhanced resistance to pathogens. *Cell* 184, 1-13.
- Takeuchi T. 2014. Progress on larval and juvenile nutrition to improve the quality and health of seawater fish: a review. *Fisheries Science* 80, 389-403.
- Tochino M, Nagano T, Satoh S, Shiratori M, Ueta Y. 2009. Effect of taurine supplement to low fish meal feed on yellowtail *Seriola quinqueradiata* in a practical net cage. *Aquaculture Science* 57, 595-600.
- Tozawa H, Kawabata T. 1987. Mechanism of N-nitrosothiazolidine formation at the stage of fish meal preparation. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53, 2209-2216.
- Wang Q, He G, Wang X, Mai K, Xu W, Zhou H. 2014. Dietary sulfur amino acid modulations of taurine biosynthesis in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 422-423, 141-145. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.014>
- Wang X, He G, Mai K, Xu W, Zhou H. 2016. Differential regulation of taurine biosynthesis in rainbow trout and Japanese flounder. *Scientific Reports* 6:article no. 21231
- Watanabe T, Aoki H, Shimamoto K, Hadzuma M, Maita M, Yamagata Y, Kiron V, Satoh S. 1998. A trial to culture yellowtail with nonfishmeal diets. *Fisheries Science* 64, 505-512.
- Watanabe T, Verakunpiriya V, Watanabe K, Kiron V, Satoh S. 1997. Feeding of rainbow trout with non-fish meal diets. 1997. *Fisheries Science* 63, 258-266.

- Wei Y, Zhang Q, Xu H, Liang MQ (2020). Taurine requirement and metabolism response of tiger puffer *Takifugu rubripes* to graded taurine supplementation. *Aquaculture* 524, p.735237.
- Wolber FM, McGrath M, Jackson F, Wylie K, Broomfeld A. 2016. Cysteic acid in dietary keratin is metabolized to glutathione and liver taurine in a rat model of human digestion. *Nutrients* 8, 104. <https://doi.org/10.3390/nu8020104>
- Yang M-J, Xu D, Yang D-X, Li L, Peng X-X, Chen Z-G, Li H. 2020. Malate enhances survival of zebrafish against *Vibrio alginolyticus* infection in the same manner as taurine. *Virulence* 11, 349-364.
- Yokoyama M, Takeuchi T, Park G-S, Nakazoe J. 2001. Hepatic cysteinesulphinatase activity in fish. *Aquaculture Research* 32, 216–222.
- Zhang Q-W, Xu H-P, Mao L-S, Jin H-X. 2019. Evaluation of cysteine sulfinatase activity in marine life by high performance liquid chromatography. *Journal of the Anhui Agricultural Science* 47, 212-215. (in Chinese with English abstract).

Desvelando el Potencial de las Algas para la Elaboración de Piensos Para Peces de Acuicultura

Alba Galafat Díaz, Antonio J. Vizcaíno Torres, M^a Isabel Sáez Casado, Tomás F. Martínez Moya, F. Javier Alarcón López*

Departamento de Biología y Geología. Ceimar-Universidad de Almería, 04120. Spain.

*Corresponding author: falarcon@ual.es

Resumen

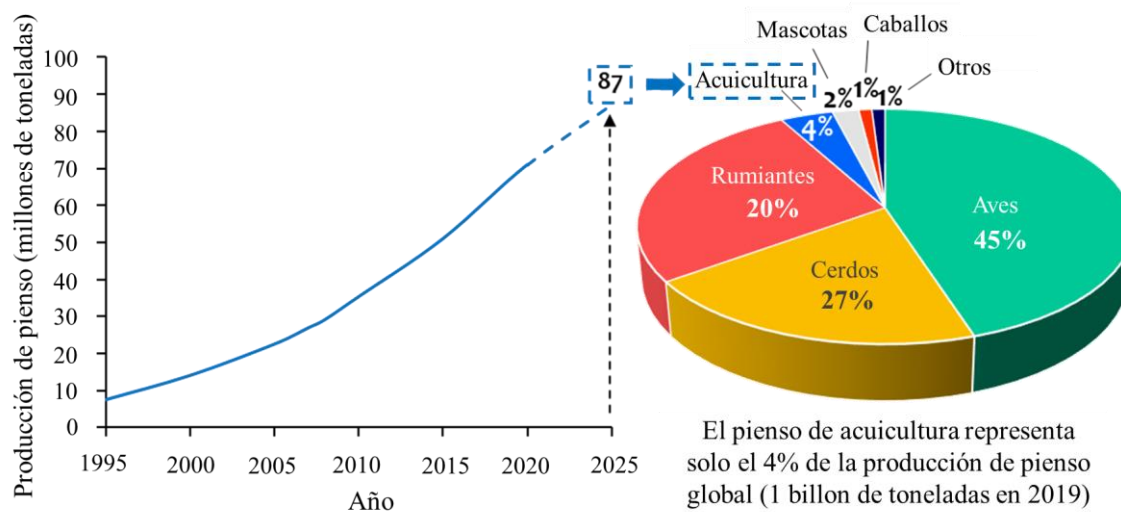
El desarrollo de piensos acuícolas sostenibles sigue siendo uno de los mayores desafíos de la acuicultura. En las últimas décadas se ha realizado un gran esfuerzo de investigación en la evaluación de ingredientes alternativos para poder reducir la dependencia sobre los ingredientes convencionales. Estos ingredientes alternativos deben de tener un valor nutricional adecuado, tener una buena disponibilidad para permitir su uso a escala industrial y ser económicamente asequibles. En este sentido, el uso de algas en piensos para acuicultura despierta un gran interés, principalmente por su composición nutricional y enorme variedad de compuestos bioactivos que contienen, así como por los beneficios que generan en los peces, como son la mejora del crecimiento, la composición proximal del músculo y funcionalidad digestiva, tal y como se evidencia en las numerosas publicaciones científicas al respecto. Sin embargo, existen ciertos aspectos que deben de considerarse para que la industria de elaboración de pienso de acuicultura pueda incorporarlas como ingredientes o aditivos en las fórmulas comerciales a gran escala, como son todos aquellos relacionados con la seguridad y las normativas regulatorias, la reducción de sus costes de producción, la variabilidad en su composición química, una mayor bioaccesibilidad de los nutrientes que contienen, o la presencia de factores antinutritivos, entre otros. Por lo tanto, en este trabajo se recopila información sobre la composición nutricional de las algas, y datos de estudios publicados en los que se describen sus efectos en los peces cuando se usan como ingrediente o como aditivo funcional en los piensos. Además, se discuten los principales retos para su uso generalizado en piensos comerciales y las perspectivas futuras.

Palabras clave: *algas, compuestos bioactivos, ingredientes alternativos, peces marinos, piensos*

1. La Demanda de Piensos para Acuicultura

Según las últimas estadísticas de la FAO, la producción de animales acuáticos logró un récord histórico en 2018, con 82,1 millones de toneladas, y se espera que alcance los 109 millones de toneladas en 2030 (FAO, 2020). Dentro de esta producción, la acuicultura basada en la producción de pescado con piensos manufacturados representa hoy en día casi el 50% de toda la producción acuícola. La Figura 1 muestra una proyección de la producción de piensos acuícolas hasta 2025. El crecimiento promedio ha sido de un 10 anual, y se espera que la producción de pienso aumente hasta 87 millones de toneladas para 2025, aunque esta cifra es bastante baja en comparación con la producción mundial de piensos para animales terrestres, ya que esta última supera los 1.000 millones de toneladas. A pesar de este hecho, los piensos acuícolas consumen el 70% de la harina de pescado, y más del 73% del aceite de pescado comercializado en el mundo.

Figura 1. Estimación de la producción de pienso de acuicultura para 2025



De hecho, la acuicultura todavía depende en gran medida de la harina y el aceite de pescado procedente de pesquerías como ingredientes de los piensos (Yadav *et al.*, 2020). Ambas materias primas se consideran los ingredientes más nutritivos, digestibles y con mayor palatabilidad para la producción de piensos acuícolas, siendo también la principal fuente de aminoácidos esenciales, fosfolípidos y ácidos grasos omega-3, entre los que destacan los ácidos docosahexaenoico (DHA) y eicosapentaenoico (EPA) (Yarnold *et al.*, 2019). Ambas materias primas provienen fundamentalmente de la pesca extractiva, por lo que los cambios en las capturas de las especies objetivo pueden afectar a su producción. Según la FAO (2020), las capturas de peces utilizados

para la producción de harina y aceite de pescado en 2018 (18 millones de toneladas) fue significativamente menor que la de 1994 (30 millones de toneladas). Esta reducción en el suministro de estas materias primas, junto con la creciente demanda impulsada por una industria acuícola en rápido crecimiento, han llevado a que los precios de la harina de pescado se tripliquen en la última década (los costes actuales de la harina y el aceite de pescado rondan los 1.120-1.730 y los 2.000 -2.200 USD por tonelada, respectivamente (HAMMERSMITH Marketing Ltd). En este escenario, aunque las tasas de inclusión de harina y aceite de pescado en los piensos de acuicultura se han reducido progresivamente, el aumento en la producción de las distintas especies de cultivo ha generado una demanda creciente de dichos ingredientes, principalmente atribuibles a la piscicultura (Naylor *et al.*, 2009). Por lo tanto, encontrar y testar fuentes alternativas de proteínas y lípidos con potencial para desarrollar alimentos acuícolas sostenibles y nutritivos sigue siendo uno de los grandes desafíos de la acuicultura actual (Yarnold *et al.*, 2019), y esta es la razón última por la que se está realizando un gran esfuerzo de investigación sobre este tema.

En este sentido, cualquier ingrediente alternativo de interés debe tener un valor nutricional comparable al de los ingredientes convencionales, y también debe de estar disponible a gran escala y ser económicamente factible su utilización en el pienso (Vizcaíno *et al.*, 2014). Los cultivos terrestres tradicionales, especialmente los cereales, las legumbres y sus derivados, son alternativas reales ya que presentan un bajo coste y se ha demostrado con éxito su uso en la elaboración de piensos de acuicultura cuando reemplazan parcialmente a la harina y al aceite de pescado, produciendo efectos positivos sobre el crecimiento de los peces. Sin embargo, a pesar de lo anterior, se ha comprobado que los ingredientes de origen vegetal presentan algunas desventajas que dificultan su inclusión en los piensos, especialmente cuando se utilizan en altos niveles de inclusión, como es una baja digestibilidad y palatabilidad, así como una limitada biodisponibilidad de nutrientes (Daniel, 2018). Además, estos ingredientes suelen tener perfiles nutricionales desequilibrados, con deficiencias en ciertos aminoácidos esenciales, como lisina, metionina, treonina y triptófano, y pueden contener factores antinutritivos que pueden afectar negativamente tanto la fisiología como al crecimiento de los peces. Por otro lado, los aceites vegetales (p. ej. aceite de colza, aceite de soja, aceite de girasol) son ricos en ácidos grasos n-6 pero pobres en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs) n-3, de tal forma que el uso excesivo de éstos puede alterar el perfil de ácidos grasos de los filetes de pescado (Shah *et al.*, 2018). Además, se han descrito fenómenos inflamatorios intestinales en salmones juveniles alimentados con un 20 %

de harina de soja, incluso cuando los periodos de alimentación fueron cortos (Booman *et al.*, 2018). En este caso, aunque el crecimiento de los peces no se afectó, la enteritis alteró la integridad de la mucosa intestinal y aumentó el riesgo de que los peces sufriesen patologías.

Todas estas consideraciones mencionadas son las razones por las que se han llevado a cabo numerosos estudios con el objetivo de evaluar otros ingredientes alternativos que no presenten dichas limitaciones. En este punto, es importante considerar que reemplazar la harina de pescado no es solo sustituir la proteína que este ingrediente proporciona, sino que supone sustituir todos los nutrientes importantes contenidos en esta materia prima (nucleótidos, ácidos grasos n-3, minerales, compuestos bioactivos, etc.). Debe tenerse en cuenta que los peces tienen requerimientos de nutrientes y no de ingredientes. Asimismo, el aceite de pescado también es más que una fuente de lípidos; es fuente de ácidos grasos n-3, pero también de colesterol, vitaminas, carotenoides y otros factores. Por esas razones, encontrar alternativas a la harina y el aceite de pescado es más que encontrar fuentes baratas de proteínas o lípidos, también es reemplazar el resto de los nutrientes esenciales que requieren los peces, incluyendo aminoácidos esenciales, nucleótidos, ácidos grasos, minerales, vitaminas y pigmentos.

En este sentido, las algas se posicionan como ingredientes alternativos interesantes para la elaboración de piensos de acuicultura (Figura 2). La composición química de algunas especies de algas ha llamado la atención de los investigadores como un recurso importante, no solo como fuente de proteínas y/o lípidos, sino también como aditivos potenciales para incorporar compuestos bioactivos y funcionales a los piensos (Shah *et al.*, 2018; Vizcaíno *et al.* al., 2019a).



Figura 2. Interés de las algas como ingredientes/aditivos para la producción de piensos de acuicultura.

2. Relevancia de las Algas en los Piensos de Acuicultura

Desde la década de 1980, las algas juegan un papel clave en la nutrición acuícola, ya sea para consumo directo o indirecto (Brown *et al.*, 1997). Sin embargo, ha sido en los últimos 15 años cuando se ha incrementado progresivamente el interés por este recurso como potencial alternativo a la harina y aceite de pescado debido a su valor nutricional, su rápido crecimiento en los sistemas en los que se cultiva, y su contenido en sustancias con capacidad antioxidante (Roy y Pal, 2015; Vizcaíno *et al.*, 2019b).

Desde un punto de vista nutricional, las microalgas pueden utilizarse como fuente natural de proteínas, lípidos, vitaminas y carotenoides (Shah *et al.*, 2018), mientras que las macroalgas son más apreciadas como fuentes de compuestos bioactivos, como pigmentos, polisacáridos, polifenoles y vitaminas (Moutinho *et al.*, 2018). Sin embargo, el valor nutricional de una determinada especie de alga depende de varios factores, como son el tamaño y la forma de las células, su digestibilidad, la presencia de factores antinutritivos, la producción de sustancias tóxicas y las necesidades nutricionales específicas de las especies animales objetivo para las que se destinen los suplementos de microalgas (Brown *et al.*, 1997).

La composición química de las algas ha sido ampliamente documentada en estudios previos (Tabla 1). En general, el contenido de proteína de las microalgas oscila entre el 30 y el 55 % (en

base a materia seca, MS) (López *et al.*, 2010), aunque existen algunos géneros, como *Anabaena* sp., *Chlorella* sp. o *Arthrospira* sp. (cianobacterias) con valores más altos (Venkataraman y Becker, 1985). En general, la proteína de microalgas muestra un perfil equilibrado de aminoácidos, similar al observado en otros ingredientes comúnmente utilizados en los piensos acuícolas (Becker, 2007). Las microalgas tienen un contenido en lípidos que oscila entre el 2 y el 50 % (MS), aunque algunos géneros superan el 80 %. Los valores habituales están en el rango de 20-50% (Chisti, 2007). El contenido de carbohidratos varía del 5 al 35%, y juega un papel importante en la digestibilidad de las microalgas (Percival y Turvey, 1974). En cuanto a las macroalgas, el contenido de proteína en las algas pardas oscila entre el 3 y el 15 %, y entre el 14 y el 47 % (MS) en el caso de las algas verdes y rojas (Arasaki y Arasaki, 1983). El contenido de lípidos totales es relativamente bajo (0,2-4% MS), mientras que la cantidad total de carbohidratos oscila entre 1,8 y 66% (MS) incluyendo azúcares simples, carbohidratos solubles, pectina, ácido algínico, carragenina y agar, entre otros (Wan *et al.*, 2019).

Tabla 1. Composición proximal (% peso seco) de diferentes especies de algas.

Microalgas marinas	Proteína	Lípidos	CHO	Fuente
<i>Anabaena</i> sp.	60,9	14,1	-	
<i>Dunaliella</i> sp.	52,3	20,3	-	
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	44,9	27,0	-	
<i>N. gaditana</i>	33,2	27,9	15,9	Di Lena <i>et al.</i> (2020)
<i>Pavlova</i> sp.	24–29	9–14	6–9	Becker (1994)
<i>Porphyridium</i> sp.	20,1	4,8	-	
<i>Schizochytrium</i> sp.	12,5	40,2	38,9	Shields y Lupatsch (2012)
<i>Tetraselmis chuii</i>	46,5	12,3	25	Tibbetts <i>et al.</i> (2015)
<i>Tetraselmis</i> sp.	27,2	14,0	45,4	Shields y Lupatsch (2012)
<i>Tetraselmis suecica</i>	26,0	14,7	24,1	Di Lena <i>et al.</i> (2020)
<i>T. suecica</i>	36,0	12,9	-	
<i>Tisochrysis lutea</i>	43,6	17,8	-	
Microalgas dulceacuícolas				
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62,0	3,0	23,0	Becker (2007)
<i>Arthrospira maxima</i>	60-71	6-7	13-16	Becker (2007)
<i>Arthrospira platensis</i>	50-65	4-9	8-14	Becker (2007)
<i>A. platensis</i>	46,8	1,4	3,3	Molino <i>et al.</i> (2018)
<i>A. platensis</i>	36,8	7,2	-	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57,0	2,0	26,0	Becker (2007)

<i>Chlorella</i> sp.	43,2	6,5	-	
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	42,8	9,6	-	
<i>S. almeriensis</i>	49,4	12,0	24,6	Sánchez <i>et al.</i> (2008)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56	12–14	10–52	Becker (2007)
<i>Spirogyra</i> sp.	25,3	9,3		
Macroalgas				
<i>Gracilaria cornea</i>	13,5	0,8	39,8	Vizcaíno <i>et al.</i> (2016a)
<i>Gracilaria lameneiformis</i>	19,2	0,5	61,3	Xu <i>et al.</i> (2011)
<i>Laminaria digitata</i>	15,9	0,5	-	Marsham <i>et al.</i> (2007)
<i>Macrocystis pyrifera</i>	5,3-6,1	0,7	-	Cruz-Suárez <i>et al.</i> (2009)
<i>Ulva fasciata</i>	8,8-12,3	3,6-5,1	-	McDermid y Stuercke (2003)
<i>Ulva ohnoi</i>	19,2	3,2	29,9	Vizcaíno <i>et al.</i> (2019a)
<i>Ulva rigida</i>	14,9	1,2	50,4	Vizcaíno <i>et al.</i> (2016a)
Ingredientes de referencia				
Harina de pescado	65,0	12,7	-	
Harina de soja	50,1	2,7	-	

CHO: carbohidratos

La proteína de las algas

El contenido de proteínas es el principal factor que determina el valor de una determinada especie de alga para su uso en nutrición acuícola (Spolaore *et al.*, 2006). La proteína de las microalgas de diferentes especies muestra perfiles de aminoácidos similares, que se caracterizan por un alto contenido en aminoácidos esenciales, como lo demuestra el estudio exhaustivo de 40 especies de microalgas realizado por Brown *et al.* (1997). Este estudio encontró que todas las especies mostraron una composición de aminoácidos similar, comparable a la de otros ingredientes convencionales. Por ejemplo, las biomásas de *Arthrospira* y *Chlorella* tienen un contenido de proteína superior al 50 %, cuya calidad es comparable a la de la levadura y la harina de soja (Kovač *et al.*, 2013).

En general, la leucina y la arginina son los aminoácidos predominantes en la proteína de microalgas. El contenido de ambos aminoácidos oscila entre 5 y 9 g por 100 g de proteína, mientras que la histidina y la metionina suelen ser los aminoácidos más limitantes, con valores en torno a 1,5 a 2 g por 100 g de proteína. Sin embargo, algunas especies como *Dunaliella*, *Scenedesmus* o *Arthrospira* (esta última es una cianobacteria) muestran un contenido de aminoácidos similar al de la harina de pescado (Tabla 2). La metionina suele ser el aminoácido más limitante en los

ingredientes utilizados para la fabricación de piensos de acuicultura, especialmente cuando se utilizan fuentes de proteínas vegetales terrestres para reemplazar ingredientes tradicionales como la harina de pescado (Mai *et al.*, 2006a; b; Tibbetts *et al.*, 2015). Por lo tanto, y en base a los requerimientos de aminoácidos de los peces de acuicultura (Wilson, 2003), la proteína de microalgas podría proporcionar la mayoría de los aminoácidos esenciales necesarios para un crecimiento adecuado de los animales.

Tabla 2. Perfil de aminoácidos (g por 100 g de proteína) de diferentes especies de algas.

Microalgas marinas	Arg	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Val	F
<i>Dunaliella sp.</i>	6,6	2,5	4,5	9,3	6,2	2,5	6,0	5,0	6,0	(2)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	5,2	1,6	3,9	7,3	4,3	1,2	4,7	4,6	4,9	(1)
<i>Tetraselmis suecica</i>	5,5	1,6	4,5	6,8	4,1	1,5	4,8	4,1	4,7	(1)
<i>Tisochrysis lutea</i>	6,6	1,8	4,1	6,9	3,8	1,3	5,9	4,6	5,0	(1)
Microalgas dulceacuícolas										
<i>Arthrospira platensis</i>	5,1	1,3	3,6	7,0	4,6	2,1	3,9	4,0	4,3	(1)
<i>Chlorella sp.</i>	2,3	0,4	1,8	5,0	2,7	0,6	3,3	2,4	3,0	(1)
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	5,8	1,7	4,3	6,9	4,8	1,3	4,5	4,1	5,0	(1)
<i>Scenedesmus sp.</i>	6,4	2,6	4,4	9,2	6,6	2,4	5,6	5,6	6,2	(2)
Macroalgas										
<i>Ulva lactuca</i>	3,6	1,8	3,7	6,7	4,2	1,6	4,0	4,7	6,2	(4)
<i>Ulva rigida</i>	4,6	1,4	3,1	5,2	3,7	1,5	3,3	5,0	5,6	(4)
Ingredientes de referencia										
Harina de pescado	5,7	2,4	4,7	7,7	7,9	3,0	4,1	4,7	5,4	(5)
Harina de soja	7,3	2,7	4,5	7,7	6,4	1,4	5,0	3,9	4,8	(5)

F: fuente.(1) Vizcaíno *et al.* (2018); (2) Kent *et al.* (2015); (3) Kristaki *et al.* (2011); (4) Shuuluka *et al.* (2013); (5) Cho y Kind (2010).

De manera similar, la proteína de las macroalgas también puede considerarse que está relativamente bien equilibrada en términos de aminoácidos esenciales (Wan *et al.*, 2019). En términos generales, muchas especies contienen la mayoría de los aminoácidos esenciales y no esenciales (Gressler *et al.*, 2010). Aunque algunas especies comercialmente importantes, como el alga roja *Palmaria palmata*, carecen de algunos aminoácidos (p. ej., cisteína), aunque son ricas en ácido aspártico y glicina, con un contenido de aminoácidos esenciales totales comparable a la proteína de soja (Galland-Irmouli *et al.*, 1999).

La mayoría de los valores publicados sobre el contenido de proteína en las algas se basan en estimaciones de la proteína cruda, que cuantifica otros componentes nitrogenados de las algas, como glucosamidas, aminas, ácidos nucleicos y componentes de la pared celular, además de la proteína. Esto ocasiona generalmente una sobreestimación sobre el verdadero contenido de proteína (Becker, 2007). Por ejemplo, el nitrógeno no proteico puede alcanzar el 11,5% en *Arthrospira*. Sin embargo, incluso con esta sobreestimación, el valor nutricional de las algas es alto, con una calidad promedio similar e incluso superior a las fuentes de proteínas vegetales convencionales.

El perfil de lípidos y de ácidos grasos de las algas

El contenido de ácidos grasos es otro factor que determina el valor nutricional de las algas (Shah *et al.*, 2018). Son numerosas las publicaciones científicas que describen el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de las especies de algas y, especialmente, de las microalgas utilizadas en acuicultura (Dunstan *et al.*, 1992; Volkman *et al.*, 1989).

En general, muchas de las especies de micro y macroalgas marinas poseen una alta proporción de PUFAs, especialmente ácidos grasos n-3 como ácido docosahexaenoico (22: 6n-3; DHA), ácido α -linolénico (18: 3n-3; ALA) y ácido eicosapentaenoico (20: 5n-3; EPA) (Brown *et al.*, 1997; Wan *et al.*, 2019) (Tabla 3). Como se muestra en la Tabla 1, las macroalgas presentan contenidos en lípidos más bajos en comparación con los observados en algunas especies de microalgas, sin embargo, las algas marinas pueden mejorar el perfil de ácidos grasos de los alimentos (Wan *et al.*, 2019; Sáez *et al.*, 2020).

Tabla 3. Contenido en ácidos grasos poliinsaturados (% del total de ácidos grasos) de diferentes especies de algas.

Microalgas marinas	18:2n-6	18:3n-3	20:4n-6	20:5n-3	22:6n-3	F
<i>Dunaliella</i> sp.	6,3	15,6		0,2	0,2	(1)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	3,5		4,6	30,1		(2)
<i>Schizochytrium</i> sp.	1-2	> 1	1	1-16	18-44	(3)
<i>Tetraselmis</i> sp.	9,7	16,2	1,0	4,7		(4)
<i>Tetraselmis</i> sp.	4-7	5-22	< 1-4	2-8	< 1	(3)
<i>Tetraselmis suecica</i>	6,9	14,9	2	6,2		(2)
<i>Tisochrysis lutea</i>	7,8	16,3	0,6	0,9	12,0	(2)
Microalgas dulceacuícolas						
<i>Scenedesmus</i> sp.	4,7	20,8				(4)
<i>Arthrospira</i> sp.	7,7			5,5		(5)
<i>Chlorella</i> sp.	17,5	20,0				(4)
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	6,3	27,9				(6)
<i>Scenedesmus</i> sp.	1-6	> 1-3				(3)
Macroalgas						
<i>Ulva lactuca</i>	9,5	0,1	1,8	1,6	0,2	(7)
<i>Ulva ohnoi</i>	2,6	9,7		0,3		(8)
<i>Ulva rigida</i>	14,3	5,2	0,5	0,4	0,5	(9)

(1) Mourente *et al.* (1990); (2) Serval *et al.* (1994); (3) Tibbetts *et al.* (2018); (4) Pratoomyot *et al.* (2005); (5) Sahu *et al.* (2013); (6) Vizcaíno *et al.* (2019b); (7) Cardoso *et al.* (2017); (8) Sáez *et al.* (2020); (9) Ivanova *et al.* (2013).

En general, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) n-3 de cadena larga están presentes principalmente en especies de microalgas marinas. Los ácidos grasos como ARA, EPA y DHA pueden ser producidos por microalgas como *Porphyridium*, *Nannochloropsis* y *Schizochytrium* sp. De hecho, esta última especie se puede utilizar como fuente de PUFAs debido al alto contenido de DHA (hasta un 49% de lípidos totales) (Ren *et al.*, 2010). Por otro lado, las microalgas verdes (Chlorophyta) son deficientes en PUFAs de cadena larga, pero contienen otros ácidos grasos, como los ácidos grasos linoleico y linolénico, que son esenciales para muchas especies de peces de agua dulce. Por lo tanto, el contenido de ácidos grasos hace que las algas (especialmente las microalgas) sean un ingrediente novedoso y valioso para reemplazar el aceite de pescado, dado que la biomasa puede utilizarse para imitar el perfil promedio de ácidos grasos que se encuentra en el aceite de pescado. Sin embargo, el uso de una sola especie de microalga no suele permitir obtener una

alternativa al aceite de pescado, ya que deben de mezclarse al menos dos cepas de microalgas marinas para lograr este objetivo.

Los carbohidratos de las algas

La composición de polisacáridos de las microalgas varía notablemente entre especies (Brown, 2002). En general, la glucosa es el azúcar predominante en algunas microalgas comúnmente evaluadas en acuicultura, como *Tisochrysis* sp. y *Chlorella* sp. (28-86% de carbohidratos totales). Asimismo, otros monosacáridos como manosa, fucosa, galactosa y xilosa, entre otros, están presentes en las microalgas, aunque en diferentes proporciones. La mayoría de estos azúcares son componentes de la pared celular, y juegan un papel clave como barrera protectora que, a su vez, reduce la biodisponibilidad de los nutrientes intracelulares. Los polisacáridos extracelulares pueden interferir con la absorción de nutrientes o, por el contrario, ser agentes aglutinantes útiles cuando se trata de formar gránulos de pienso.


Por otro lado, los carbohidratos constituyen uno de los principales componentes de algas marinas, alcanzando valores del 2% al 66%. Diversos tipos de polisacáridos están presentes en las algas marinas y pueden influir tanto en la calidad del alimento (como agentes gelificantes y estabilizantes) como en los propios animales, constituyendo una fuente de polisacáridos distintos del almidón. Si bien ciertas fracciones de carbohidratos, como el ulvano o el β -glucano, pueden tener efectos funcionales en los peces, otros carbohidratos complejos, como polisacáridos no amiláceos, pueden inducir efectos negativos sobre la absorción de nutrientes, el rendimiento del crecimiento y la morfología intestinal. Esto último puede ser de gran interés en el caso de peces carnívoros, en los que los carbohidratos se digieren y metabolizan relativamente mal para ser utilizados como fuente de energía (Wan *et al.*, 2019). La eficiencia de los peces para digerir la pared celular de las algas depende tanto de la composición de los carbohidratos, como de las uniones existentes entre los monómeros que los componen, y también de la existencia o no de las enzimas digestivas adecuadas en las diferentes especies de peces. En general, las especies herbívoras y omnívoras poseen una gama más amplia de carbohidrasas que las que presentan los peces carnívoros.

Los pigmentos de las algas

A grandes rasgos, las algas tienen un contenido adecuado en carotenoides de alto valor, como el β -caroteno y la astaxantina (Figura 3), que se utilizan comúnmente en la acuicultura por sus propiedades colorantes y antioxidantes, mejorando la calidad y el valor comercial de los peces (Yarnold *et al.*, 2019). El β -caroteno es uno de los pigmentos más demandados con una amplia variedad de aplicaciones en el mercado: i) provitamina A (retinol) en alimentos y piensos, ii) como colorante alimentario, aditivo para cosméticos y preparaciones multivitamínicas, y iii) como aditivo alimentario en la categoría de antioxidantes. Este pigmento puede ser producido naturalmente por el género *Dunaliella*, que puede sintetizar y acumular hasta el 16% de su peso seco en forma de β -caroteno (Lers *et al.*, 1990). La astaxantina es otro pigmento que puede ser sintetizado por las microalgas *Haematococcus*, *Chlorella zofingiensis* y *Chlorococcum* sp. (Del Campo *et al.*, 2004). Este compuesto presenta tal actividad antioxidante que se ha propuesto como “supervitamina E” (Nakagawa *et al.*, 2011). Como colorante natural, la astaxantina se usa comúnmente como fuente de pigmentación en la industria acuícola (Canales-Gómez *et al.*, 2010), y en general, es considerado el carotenoide más importante en el cultivo del salmón y la trucha arco iris (Shah *et al.*, 2016; Tolasa *et al.*, 2005). Estos pigmentos no pueden ser sintetizados *de novo* por los salmónidos y, por lo tanto, deben suministrarse a través del alimento.

Astaxantina


CC1=C(C)C(=O)C(=C(C)C)C(=O)C1



- Propuesto como “Super vitamina E” con actividad antioxidante
- Utilizado como pigmentante en filetes de salmón
- Protege a los peces contra enfermedades

Beta caroteno


CC1=CC(=C(C)C)C(=O)C1




- Diferentes aplicaciones: pigmento, precursor de la vitamina A en piensos, y como aditivo para promover la salud

Luteína

CC1=CC(=C(C)C)C(=O)C1



- Usado como pigmento



Estos compuestos juegan un papel en la estimulación del sistema inmune en peces

Figura 3. Interés de las algas como fuente de pigmentos en los piensos de acuicultura.

Recientemente, Sales *et al.* (2020) analizaron la composición de la fracción carotenoide obtenida de la microalga *Nannochloropsis gaditana* (Tabla 4), y encontraron que la violaxantina, el β -caroteno y la neoxantina eran los más abundantes en los extractos, y el éster de vaucheroxantina y cantaxantina, los menos abundantes. Estos autores evaluaron el extracto lipídico de *N. gaditana* como aditivo para piensos de juveniles de dorada. El uso de los compuestos extraídos, en lugar de toda la biomasa microalgal, puede ser eficaz para mejorar la biodisponibilidad de estos compuestos. De hecho, los pigmentos extraídos de *Arthrospira platensis*, *Haematococcus pluvialis* y *Chlorella* sp. han sido incorporados con éxito como suplementos para la alimentación de larvas de *Lates calcarifer* (Gora *et al.*, 2019).

Tabla 4. Contenido en carotenoides (mg kg^{-1}) del extracto lipídico no saponificable obtenido de *Nannochloropsis gaditana* (Datos de Sales *et al.*, 2020).

Carotenoides	Extracto lipídico no saponificable
Neoxantina	754,97 \pm 149,19
Violaxantina	2137,29 \pm 254,97
Anteraxantina	417,51 \pm 70,36
Vauqueroxantina	78,81 \pm 10,60
Zeaxantina	58,32 \pm 8,14
Ester Vauqueroxantina	13,47 \pm 2,38
Cantaxantina	14,09 \pm 2,24
β -caroteno	925,51 \pm 145,40
Total	4399,97 \pm 643,27

3. El Uso de Algas Como Ingrediente en Piensos de Acuicultura

El perfil nutricional y la variedad de compuestos nutraceuticos presentes en las algas justifican su uso potencial como ingrediente y también como aditivo en piensos para peces de acuicultura. De hecho, existe abundante literatura científica centrada en la evaluación de piensos suplementados con algas, ya sea como fuente de proteína, o de lípidos, y como aditivos funcionales para piensos acuícolas (Tabla 5 y 6).

Tabla 5. Estudios recientes sobre aplicación de microalgas en piensos.

Microalgas	Pez	Uso	Efectos en el pez
<i>Arthrospira</i> sp.	<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	4% IA	(↔) Crecimiento, (↑) Respuesta antioxidante e inmune
<i>Arthrospira</i> sp.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	7.5% RFM	(↔) Crecimiento, (↑) Concentración de carotenoides en piel y filete (↑) actividad enzimática digestiva, (↑) Estructura de la mucosa intestinal, y (↓) oxidación lipídica del músculo
<i>Arthrospira</i> sp.	<i>Sparus aurata</i>	4% IA	(↑) crecimiento, (↑) actividad de enzimas antioxidantes y metabolismo lipídico
<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	15% RFM	(↔) crecimiento, factor de condición, eficiencia proteica y composición proximal
<i>Desmodesmus</i> sp.	<i>Salmo salar</i>	10% RFM	(↔) Consumo de alimento, crecimiento (↑) pigmentación verdosa de la piel
<i>Isochrysis</i> sp.	<i>Dicentrarchus labrax</i>	36% RFO	(↑) consumo de alimento y crecimiento
<i>Nannochloropsis</i> y <i>Isochrysis</i> sp.	<i>Gadus morhua</i>	15% RFM	(↔) crecimiento y utilización del alimento
<i>Nannochloropsis</i> y <i>Schizochytrium</i> sp.	<i>P. olivaceus</i>	100% RFO	(↔) crecimiento, composición proximal e integridad intestinal
<i>Nannochloropsis</i> sp.	<i>D. labrax</i>	15% RFM	(↔) crecimiento y utilización del alimento
<i>Pavlova viridis</i> y <i>Nannochloropsis</i> sp.	<i>D. labrax</i>	100% RFO	(↔) crecimiento, digestibilidad y utilización del alimento
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>S. salar</i>	6% RFM	(↔) crecimiento y utilización del alimento (↑) actividad enzimática intestinal y superficie de absorción
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	<i>S. aurata</i>	38% RFM	(↔) consumo de alimento, crecimiento, composición proximal (↑) contenido en PUFAs n-3
<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>S. salar</i>	10% RFM	(↔) salud y calidad nutricional del filete
<i>Schizochytrium</i> sp.	<i>S. salar</i>	5% RFM	(↑) crecimiento, utilización del alimento y contenido en PUFAs n-3 en el filete
<i>Schizochytrium</i> sp.	<i>Oreochromis niloticus</i>	100% RFO	(↔) crecimiento
<i>Spirulina maxima</i>	<i>O. niloticus</i>	30% RFM	(↑) crecimiento y conversión alimentaria
<i>Spirulina</i> sp.	<i>Puntius gelius</i>	20% RFM	

<i>T. galbana</i> , <i>S. almeriensis</i> y <i>N. gaditana</i>	<i>Solea senegalensis</i>	15% RFM	(↔) crecimiento y utilización del alimento (↑) Capacidad de absorción intestinal
<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>D. labrax</i>	20% RFM	(↔) crecimiento

Uso: **RFM:** sustitución de harina de pescado; **RFO:** sustitución de aceite de pescado; **IA:** inclusión de alga.

S: (1) Liu *et al.* (2020); (2) Teimuri *et al.* (2013); (3) Galafat *et al.* (2020); (4) Rahimnejad *et al.* (2017); (5) Kiron *et al.* (2016); (6) Tibaldi *et al.* (2015); (7) Walker y Berlinsk (2011); (8) Qiao *et al.* (2014); (9) Valente *et al.* (2019); (10) Haas *et al.* (2016); (11) Sørensen *et al.* (2016); (12) Vizcaíno *et al.* (2014); (13) Gong *et al.* (2019); (14) Kousoulaki *et al.* (2015); (15) Sarker *et al.* (2016); (16) Rincón *et al.* (2012); (17) Hajiahmadian *et al.* (2012); (18) Vizcaíno *et al.* (2018); (19) Tulli *et al.* (2012).

Tabla 6. Estudios recientes sobre aplicación de macroalgas como ingrediente/aditivo en piensos de acuicultura.

Macroalgas	Pez	Uso	Efectos en el pez	S
<i>Palmaria palmata</i>	<i>Salmo salar</i>	15% IA	(↔) crecimiento y utilización del alimento	(1)
<i>Porphyra dioica</i> y <i>Ulva</i> sp.	<i>Oreochromis niloticus</i>	10% IA	(↔) crecimiento y composición corporal	(2)
<i>Sargassum horneri</i>	<i>Scophthalmus maximus</i>	10% IA	(↔) crecimiento (↑) respuesta inmune no específica y resistencia a bacterias patógenas	(3)
<i>Ulva lactuca</i>	<i>Solea senegalensis</i>	10% IA	(↔) crecimiento y utilización del alimento	(4)
<i>U. ohnoi</i>	<i>S. senegalensis</i>	5% IA	(↓) crecimiento y actividad proteasa. (↑) superficie de absorción intestinal	(5)
<i>U. rigida</i> y <i>Gracilaria cornea</i>	<i>Sparus aurata</i>	15% IA	(↔) crecimiento y composición corporal (↔) estructura intestinal	(6)

Use: **AI:** algae inclusion. **Effect:** (↓) reduced; (↑) increased/improved; (↔) no effect. **S:** ⁽¹⁾ Wan *et al.* (2016); ⁽²⁾ Silva *et al.* (2015); ⁽³⁾ Wang *et al.* (2019); ⁽⁴⁾ Moutinho *et al.* (2018); ⁽⁵⁾ Vizcaíno *et al.* (2019a); ⁽⁶⁾ Vizcaíno *et al.* (2016a).

En estudios previos se ha comprobado que la sustitución de la harina de pescado por algas en el pienso a un bajo nivel (alrededor del 0,5 - 10%) ejerce efectos positivos sobre los animales. Por ejemplo, la inclusión de hasta un 7,5% de *Arthrospira* sp. en las dietas para trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) no afectó negativamente el crecimiento y la utilización de nutrientes. El peso y la concentración de carotenoides en la piel y los filetes fueron mayores en los peces alimentados con una dieta suplementada con microalgas al 7,5% (Teimouri *et al.*, 2013). Del mismo modo, se han evaluado con éxito dietas para salmón atlántico (*Salmo salar*) con un 5 o 10%

de reemplazo de la harina de pescado por biomasa de *Scenedesmus* sp. y *Desmodesmus* sp. al 5 o 10%, sin causar efectos negativos sobre el crecimiento, la utilización de nutrientes y la composición proximal del músculo de los peces (Kiron *et al.*, 2016), e incluso se informó de un incremento en el contenido total de PUFAs n-3 en el pescado (Gong *et al.*, 2019). La inclusión de hasta un 15% de *Nannochloropsis gaditana*, *Tisochrysis lutea* y *Scenedesmus almeriensis* resultó exitosa en dietas para lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Vizcaíno *et al.* (2014) también señalaron que la inclusión de hasta un 38% de *S. almeriensis* en dietas para juveniles de dorada (*S. aurata*) causó un efecto positivo en la funcionalidad intestinal.

Por otro lado, las microalgas podrían ser un ingrediente clave para diseñar una alternativa al aceite de pescado que contenga ácidos grasos esenciales, como EPA y ARA. Recientemente, Tibaldi *et al.* (2015) obtuvieron resultados alentadores en peces marinos. Estos autores utilizaron biomasa de *T. lutea* para sustituir hasta un 36% del aceite de pescado, y no encontraron efectos adversos sobre el crecimiento de la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*). De manera similar, *Schizochytrium* sp. se ha utilizado con éxito en diferentes especies de peces. El alto contenido de DHA de este microorganismo heterótrofo ha permitido la sustitución total del aceite de pescado en dietas para tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Sarket *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos revelaron efectos positivos sobre el crecimiento y la utilización de nutrientes, así como una acumulación de PUFAs n-3 en los filetes del pescado.

En los últimos años, las macroalgas también han sido evaluadas como un recurso novedoso y sostenible para la fabricación de alimentos acuícolas (Vizcaíno *et al.*, 2016a; 2019a). A pesar de que su contenido en proteína es bajo en comparación con otros ingredientes utilizados en la elaboración de piensos, las algas marinas son ricas en compuestos biológicamente activos, como polisacáridos, pigmentos, polifenoles y vitaminas, que pueden ejercer ciertos efectos beneficiosos en los peces (Wan *et al.*, 2019). En general, existen numerosos estudios que revelan resultados positivos en términos de crecimiento, supervivencia y utilización de nutrientes en diferentes especies de peces de piscifactoría cuando se alimentan con piensos enriquecidos con algas marinas hasta un nivel de inclusión del 10-15%. Algunas especies del género *Ulva* han sido evaluadas con éxito como ingrediente para la alimentación de dorada (Vizcaíno *et al.*, 2016a), lenguado senegalés (Moutinho *et al.*, 2018) o tilapia (Silva *et al.*, 2015) sin que se hayan descrito efectos negativos sobre el crecimiento y la utilización de nutrientes. De manera similar, la inclusión de hasta un 10% de *Sargassum horneri* no causó efectos adversos sobre el crecimiento de juveniles de rodaballo

(*Scophthalmus maximus*), y mejoró la actividad de ciertas enzimas asociadas al sistema inmune no específico y la resistencia contra bacterias patógenas (Wan *et al.*, 2019).

En resumen, los efectos beneficiosos descritos en literatura asociados al uso de las algas ha sido diversos, tales como: i) mejora del crecimiento, utilización del alimento y tasa de supervivencia, ii) aumento del metabolismo de los lípidos, iii) propiedades antioxidantes, iv) mejora de la composición corporal y la calidad del filete, v) mejora de la pigmentación de la piel y del filete, vi) mejora de la integridad de la mucosa intestinal, vii) mejora de las actividades enzimáticas digestivas, viii) refuerzo del sistema inmune, y, ix) mejora de la resistencia al estrés y frente a patógenos.

Teniendo en cuenta la composición nutricional y los efectos producidos sobre los animales, parece que las algas son ingredientes/aditivos interesantes para su inclusión en los piensos para piscicultura. Las especies de peces herbívoras y omnívoras toleran bien altos niveles de inclusión de algas en comparación con las especies de peces carnívoros. Sin embargo, los resultados sugieren que el nivel óptimo de inclusión de algas en la dieta debería variar según la especie concreta de alga y de pez de cultivo considerados. En este sentido, el efecto de las algas parece ser dosis dependiente y especie específico y, en consecuencia, es difícil establecer una regla general sobre el uso de algas en alimentos de acuicultura. Por lo tanto, se debe llevar a cabo un estudio específico para cada caso concreto, siendo necesaria una investigación más profunda para cada caso concreto.

4. Los Retos Actuales en el uso de las Algas en Piensos de Acuicultura

Aspectos normativos y de seguridad de las algas en piensos acuícolas

El uso de algas en alimentos y piensos es cada vez más relevante, ya que los componentes de las algas tienen el potencial de ser competitivos con los mismos componentes de otros orígenes. Por ejemplo, las microalgas utilizadas comúnmente para la producción de suplementos alimenticios, como las especies del género *Isochrysis*, *Chaetoceros*, *Tetraselmis*, *Pavlova*, *Skeletonema*, *Dunalliella*, *Nannochloropsis*, *Phaedactylum* o *Chlorella*, no producen toxinas, pero, debe tenerse en cuenta que, incluso dentro de una especie determinada, existen diferencias entre cepas tóxicas y no tóxicas. Por ello, es muy importante conocer sus aspectos de seguridad a nivel de especie. La competitividad de los productos a base de algas se basa no solo en aspectos técnicos y económicos, sino también en la normativa que regula su uso (Enzing *et al.*, 2014). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha analizado los aspectos de seguridad de las algas

utilizadas en piensos. La comercialización de algas o sus componentes en el mercado de la Unión Europea para la alimentación humana y animal está regulada por tres disposiciones legales: i) Reglamento CE 178/2002, sobre seguridad alimentaria; ii) Reglamento CE 258/97, sobre nuevos alimentos e ingredientes alimentarios; y iii) el reglamento CE 1924/2006, sobre declaración de propiedades nutricionales y de salud para los alimentos. Dado que varios compuestos derivados de las algas se utilizan como aditivos para piensos, también se aplica el Reglamento (CE) 1333/2008. En el pasado, antes de la comercialización, las empresas productoras de alimentos y piensos estaban obligados a solicitar una autorización para el uso de proteína derivada de algas en los piensos con arreglo a la Directiva 82/471 / CEE. La evaluación de la seguridad y el valor nutricional debe realizarse de acuerdo con las directrices de la Directiva 83/228 / CEE utilizando la “Guía para la evaluación de biomasas para uso en la nutrición animal” publicada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2011).

Las algas pertenecen al grupo “algas y procariotas” en el Anexo I del Reglamento CE 752/2014. Las algas o sus productos utilizados como pienso deben cumplir todos los niveles máximos legales mencionados en la Directiva 2002/32/CE. El reglamento UE 68/2013 estableció el “Catálogo de Materias Primas” e incluye las algas dentro del grupo 7 de la lista de materias primas para la alimentación, concretamente en “Otras plantas, algas y productos derivados de las mismas” (Tabla 7). Dentro de la Unión Europea, la EFSA requiere la evaluación de la seguridad de cualquier compuesto nuevo destinado a su uso en alimentos y piensos antes de que se autorice su comercialización.

Tabla 7. Información en el grupo “Otras plantas, algas y productos derivados de las mismas” (fuente: Reglamento (UE) n° 68/2013 de la Comisión, de 16 de enero de 2013, sobre el Catálogo de materias primas para piensos).

Nombre ⁽¹⁾	Descripción	Declaraciones obligatorias
Algas	Algas vivas o procesadas, incluidas las algas frescas, refrigeradas o congeladas. Puede contener hasta un 0,1% de agentes antiespumantes	Proteína Lípidos Cenizas
Algas secas	Producto obtenido por secado de algas. Este producto puede haber sido lavado para reducir el contenido de yodo. Puede contener hasta un 0,1% de agentes antiespumantes	Proteína Lípidos Cenizas
Harina de algas	Producto de la fabricación de aceite de algas, obtenido por extracción de algas. Puede contener hasta un 0,1% de agentes antiespumantes	Proteína Lípidos Cenizas
Aceite de algas	Producto de la elaboración de aceite a partir de algas obtenido por extracción. Puede contener hasta un 0,1% de agentes antiespumantes	Lípidos Humedad si > 1%
Extracto de algas	Extracto acuoso o alcohólico de algas que contiene principalmente hidratos de carbono. Puede contener hasta un 0,1% de agentes antiespumantes	
Harina de macroalgas	Producto obtenido por desecación y trituración de macroalgas, en particular algas pardas. Este producto puede haber sido lavado para reducir el contenido de yodo. Puede contener hasta un 0,1% de agentes antiespumantes	Cenizas

(1) El nombre debe de venir acompañado de la especie de la que procede.

El coste económico de las algas

El uso de algas en lugar de harina de pescado en los piensos de acuicultura permitiría desvincular la producción acuícola de las pesquerías silvestres. Hasta ahora, la harina y el aceite de pescado son sustancialmente más baratos que las microalgas, lo que impide que éstas ingresen al mercado de alimentos acuícolas, aunque, la falta de alternativas a las microalgas para la alimentación de larvas y juveniles de peces asegura un mercado para las microalgas en los criaderos de peces. Por

tanto, el uso de algas como ingrediente de piensos en alimentos acuícolas parece prometedor, ya que las microalgas presentan un contenido adecuado de proteínas y lípidos. Se pueden utilizar en piensos con niveles de inclusión de alrededor del 10 % y, además, se han comprobado que producen ciertos efectos positivos en la salud de los animales. La sustitución de la harina de soja en la producción de piensos compuestos representa un mercado potencialmente interesante para las algas (Pereira *et al.*, 2020). Las perspectivas para el uso de microalgas como aditivos para piensos son prometedoras, debido al diverso rango de efectos positivos que han sido descritos sobre la salud y el estado de condición general de los peces. Además, el objetivo en ciertos países de reducir el uso de antibióticos es un factor impulsor para aplicar otros aditivos alimentarios que mejoran la salud, siendo las algas y sus derivados candidatos potenciales para este fin.

Un factor crítico que determinará la viabilidad comercial de las algas es su competitividad en comparación con otras fuentes de materias primas que actualmente están en el mercado. Por ejemplo, una aplicación importante para la producción de microalgas es la extracción de lípidos para la obtención de biocombustibles. Sin embargo, aunque la biomasa de algas es una alternativa más ecológica y respetuosa con el medio ambiente, el biocombustible aún no es competitivo en comparación con los combustibles fósiles (Cuéllar-Bermúdez *et al.*, 2015). La misma situación se aplica en el caso de las algas para alimentos acuícolas comerciales. La competitividad de las microalgas podría incrementarse aún más adoptando una visión holística, y maximizando la extracción de todos los componentes de alto valor disponibles en la biomasa mediante una biorefinería en cascada. De manera similar, las macroalgas marinas son ideales para la biorefinería en cascada, porque contienen muchos componentes de alto valor, junto con componentes voluminosos de bajo valor que se consideran materias primas con cierto valor económico para la industria (Cian *et al.*, 2012). Actualmente, el coste más elevado de las microalgas en comparación con los ingredientes tradicionales (Figura 4) limita su aplicación en la alimentación de especies de peces de alto valor económico (Yarnold *et al.*, 2019). Se ha estimado que se necesitarían precios de harina de algas de 0,66 y 2,65 € por kg para reemplazar la harina de pescado y la harina de soja, respectivamente, en las dietas para tilapia (un pez de valor relativamente bajo). El estudio de Vizcaíno *et al.* (2014) señala que las tecnologías de cultivo deberían reducir sustancialmente el costo de producción de microalgas, pero incluso considerando un costo de 5,5 € por kg, el precio de la biomasa de microalgas sigue siendo una limitación importante para su utilización a gran escala en la industria de piensos acuícolas (Norsker *et al.*, 2011). Dado que las algas son costosas

de producir, especialmente las microalgas, es probable que su uso como ingredientes mayoritarios para fórmulas de piensos acuícolas requiera de una mayor eficiencia de producción y una mayor reducción de costes mediante el uso de enfoques de biorrefinería. Sin embargo, su principal ventaja, desde un punto de vista económico, es su riqueza en ácidos grasos, pigmentos, vitaminas, minerales y compuestos bioactivos, lo que las convierte en excelentes aditivos y suplementos de alto valor biológico para incluir en una amplia gama de alimentos acuícolas, incluso cuando se usan en bajos niveles de inclusión.

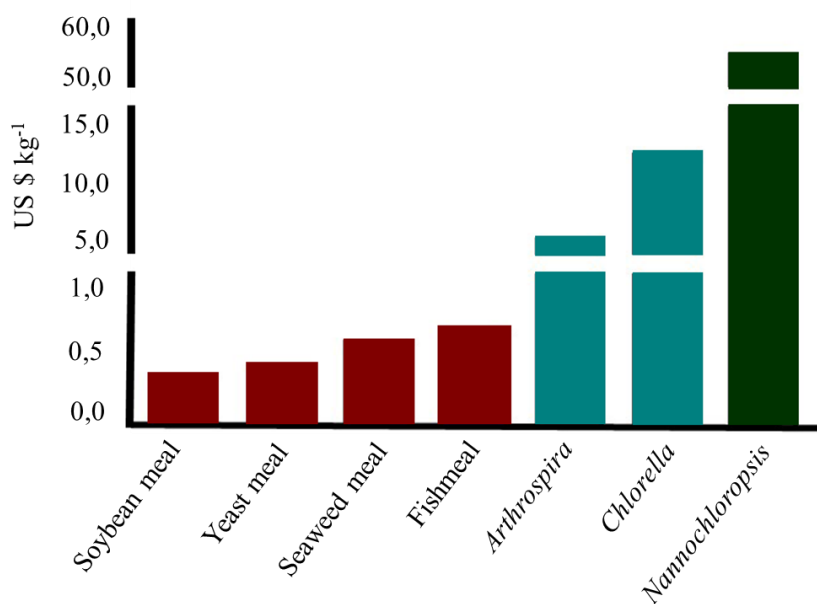


Figura 4. Comparación de los precios de distintos ingredientes para la formulación de piensos con las microalgas. Imagen modificada de Yarnold *et al.* (2019).

Un ejemplo de biorrefinería en cascada ha sido el recientemente finalizado proyecto SABANA (subvención # 727874 del Programa de Investigación e Innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea), que tuvo como objetivo desarrollar una biorefinería integrada a gran escala basada en microalgas para la obtención de productos de alto valor para la acuicultura. En este proyecto, se utiliza agua de mar natural y luz solar para el producir microalgas. En lugar de fertilizantes químicos, los efluentes de actividades agroindustriales se utilizan como fuente de nutrientes para producir grandes cantidades de biomasa que se procesa para obtener productos para su uso en piensos acuícolas. Este proyecto se estructura en dos grandes actividades; i) la mejora de la

tecnología para la producción de biomasa a gran escala (incluidos los aspectos biológicos, de ingeniería y de sustentabilidad), y ii) el desarrollo de métodos para la utilización integral de la biomasa (incluyendo cosecha, procesamiento y evaluación de productos comerciales). El objetivo de este proyecto ha sido conseguir un proceso con residuo cero en una instalación de 1 hectárea ubicada en la Universidad de Almería, con capacidad para producir biomasa de algas con un coste económico en torno a 1 € por kg de peso seco.

La variabilidad en la composición de nutrientes

Un desafío adicional, particularmente relevante en la producción de algas, es la variabilidad en su composición nutricional, que depende en gran medida de la especie concreta, el medio de crecimiento, el período de recolección y el método de producción, entre otros factores. Por ejemplo, el contenido en proteína puede variar según la estación, la temperatura y el lugar en el que se cultivan y/o cosechan las algas (Joubert y Fleurence, 2008). La proporción relativa de distintas proteínas también puede diferir, cambiando consecuentemente las concentraciones de aminoácidos. Por ejemplo, el monitoreo anual de *Palmaria palmata* recolectada en la costa atlántica mostró que los niveles de proteína eran más altos en los meses de invierno y primavera, variando del 9 al 25% y alcanzando su punto máximo en mayo (Galland-Irmouli *et al.*, 1999). En el caso de las microalgas, Adams *et al.* (2013) describieron que el efecto a corto plazo de la limitación de nitrógeno generalmente produce un aumento en el contenido de lípidos y carbohidratos, y una disminución en la tasa de crecimiento y el contenido de proteína cruda, aunque el grado de esta respuesta varía notablemente entre especies. A la luz de los datos, se espera que el desarrollo de protocolos para optimizar la composición bioquímica de las algas juegue un papel importante en los futuros procesos de producción.

La presencia de factores antinutritivos

La presencia de factores antinutritivos es uno de los problemas más importantes derivados del uso de nuevos ingredientes en los piensos acuícolas. Estos compuestos pueden ejercer efectos negativos sobre la absorción de nutrientes y micronutrientes, dificultando el normal funcionamiento de determinados órganos, por lo que representan uno de los principales inconvenientes que limitan su uso práctico en piensos (Vizcaíno *et al.*, 2020).

Los factores antinutritivos comprenden una amplia variedad de compuestos, como inhibidores de proteasa, fitohemaglutininas, lectinas, ácido fítico, saponinas, fitoestrógenos o antivitaminas (Prabhu *et al.*, 2017). En general, estas sustancias se han relacionado con piensos elaborados con ingredientes de origen vegetal, aunque estudios recientes también han documentado su presencia en algunas especies de algas (Oliveira *et al.*, 2009; Mæhre, 2015; Vizcaíno *et al.*, 2020). En general, la capacidad de las microalgas para inhibir las proteasas digestivas de los peces resultó baja, con valores de inhibición inferiores al 20% frente a los ensayos de control (Vizcaíno *et al.*, 2020). Sin embargo, otros estudios señalaron la existencia de inhibidores de la proteasa en algunas especies de macroalgas como *Ulva rigida*, *Ulva ohnoi*, *Gracilaria cornea* y *Sargassum* sp., que pueden ocasionar no solo un menor grado de proteólisis en el tracto digestivo, sino también un aumento de la secreción pancreática como compensación frente a los efectos antinutricionales (Sáez *et al.*, 2013; Diken *et al.*, 2016; Vizcaíno *et al.*, 2019a; 2020).

Sáez *et al.* (2013) evaluaron el efecto de la inclusión de *Gracilaria cornea* y *Ulva rigida* como ingredientes sobre la actividad proteolítica intestinal de juveniles de dorada. Los resultados obtenidos evidenciaron que las proteasas digestivas se vieron afectadas por las dietas suplementadas con algas, ya que los peces mostraron diferentes niveles de actividad de las enzimas proteolíticas alcalinas intestinales después tras 70 días de alimentación. En particular, las actividades proteolíticas digestivas en los peces alimentados con dietas suplementadas con *Ulva* fueron significativamente más bajas que las de los peces alimentados con la dieta de control. La presencia de inhibidores de proteasa en macroalgas puede contribuir a la disminución progresiva de la actividad proteolítica en peces alimentados con las dietas que incluyen niveles crecientes de *Ulva*. Sin embargo, la disminución en el nivel de actividad de la proteasa alcalina no estuvo acompañada por una disminución en el crecimiento de los peces y la utilización de alimento, ya que todos los peces crecieron de manera similar. Santigosa *et al.* (2010) demostraron la existencia de un mecanismo de compensación contra los inhibidores de la proteasa en doradas que fueron

alimentadas con una dieta enriquecida en inhibidor de tripsina de soja. Un fenómeno similar podría explicar el resultado con *Ulva*.

Vizcaíno *et al.* (2020) también evaluaron en la biomasa de *Ulva ohnoi* la existencia de sustancias capaces de inhibir a las proteasas digestivas de la dorada, el lenguado senegalés y la lubina. En ese estudio, se obtuvieron gráficos de inhibición y zimogramas para ilustrar la respuesta de las proteasas de pescado tras su incubación con *U. ohnoi* cruda o tratada térmicamente. Las proteasas digestivas de estos peces marinos mostraron susceptibilidad frente a los potenciales inhibidores de la proteasa presentes en *Ulva*, aunque se necesitó una concentración considerablemente alta para producir valores elevados de inhibición. Según la estimación de Vizcaíno *et al.* (2020), la cantidad de *Ulva* requerida para alcanzar el 50% de inhibición de las proteasas digestivas correspondería con un nivel de inclusión en el pienso de aproximadamente un 40% a un 53%, resultando estas inclusiones poco factibles o usuales en la formulación práctica de piensos comerciales. Además, el efecto de un tratamiento térmico de *Ulva* puso de manifiesto que estos potenciales inhibidores fueron susceptibles a la temperatura. De hecho, cuando se sometió la biomasa a un tratamiento a 80 °C durante 15 min se redujo su capacidad inhibidora en un 50%, y en más de un 75% cuando se aplicaron tratamientos más prolongados. La desactivación de factores antinutritivos también es un tema importante a considerar en el procesamiento de materias primas durante la fabricación del pienso, y en el caso de *U. ohnoi*, el tratamiento térmico parece ser suficiente para inactivar estos compuestos.

La digestibilidad de las algas

No solo la composición de nutrientes de las algas determina su interés como ingredientes en los alimentos acuícolas, sino también factores como el poder atrayente del alimento (por ejemplo, el olor, el sabor), accesibilidad (por ejemplo, el tamaño de célula, la flotabilidad) y la disponibilidad de nutrientes. Las características de la pared celular de la mayoría de las algas es un factor que limita su digestibilidad y la asimilación de sus nutrientes intracelulares, especialmente en los peces carnívoros que presentan una digestión rápida (por ejemplo, como ocurre en lubina o en rodaballo). La eficiencia de los peces para digerir las paredes celulares depende, por un lado, de la composición de carbohidratos que conforman la pared celular, de cómo están vinculados esos carbohidratos entre sí, y de la existencia de las carbohidrasas digestivas adecuadas del pescado. En general, las especies herbívoras y omnívoras poseen una amplia gama de carbohidrasas, pero los peces

carnívoros no, y este hecho debe tenerse en cuenta a la hora de formular piensos acuícolas (Shi *et al.*, 2017). En consecuencia, puede ser razonable pensar que cualquier estrategia dirigida a mejorar la biodisponibilidad de los nutrientes intracelulares podría ser de gran interés para el uso de algas en alimentos acuícolas. Se han evaluado varios procedimientos con el objetivo de liberar estos componentes de las algas (Tibbetts *et al.*, 2017; Teuling *et al.*, 2019) pero, cuando se trata de lisis celular a gran escala, la hidrólisis enzimática es probablemente una de las estrategias más prometedoras, sobre todo debido a su viabilidad económica. Al utilizar este procedimiento, incluso un nivel bajo de inclusión de algas hidrolizadas podría mejorar aspectos fisiológicos en los peces, de una manera similar a cuando se incluyen mayores cantidades de algas crudas en los piensos (Tchorbanov y Bozhkova, 1988; Galafat *et al.*, 2020). De manera alternativa, la fermentación también puede aumentar la digestibilidad de las proteínas debido a la degradación de los polisacáridos recalcitrantes de la pared celular de las algas. Esto último ya ha sido descrito tras la fermentación de la biomasa de *Palmaria palmata* utilizando el hongo *Trichoderma pseudokoningii*, donde se observó que se disminuía el contenido de xilano (Marrion *et al.*, 2003).

Han sido pocas las investigaciones realizadas con el objetivo de conocer la capacidad de las enzimas digestivas de los peces para digerir la proteína de las algas (Tibbetts *et al.*, 2015; 2016; Vizcaíno *et al.*, 2019b). La evaluación *in vitro* realizada por Vizcaíno *et al.* (2019b) evidenció que la hidrólisis proteica de las microalgas alcanza valores cercanos al 50%, siendo éstos similares a los descritos en otras materias primas comúnmente utilizadas en piensos, como el concentrado de proteína de soja o la harina de pescado. En algunas especies de microalgas, como *Tysochrysis* sp. o *Dunaliella* sp., se pueden alcanzar valores de hidrólisis más altos (> 75%) tras la simulación digestiva con extractos enzimáticos de *S. aurata*. La elevada proteólisis podría estar relacionada con el hecho de que estas microalgas no tienen pared celular y, en consecuencia, es razonable que las células puedan ser fácilmente hidrolizadas por las enzimas digestivas de los peces (Vizcaíno *et al.*, 2019b). Por el contrario, en otras especies, como *Nannochloropsis* sp., *Chlorella* sp. o *Scenedesmus* sp., la proteína es menos susceptible a la acción de las proteasas, por lo que los valores de proteólisis son inferiores al 50%. Estas microalgas sí que poseen una pared celular gruesa que contiene celulosa, hemicelulosa, pectina y glicoproteína, lo que parece determinar una menor biodisponibilidad de los componentes intracelulares (Bernaerts *et al.*, 2018). A pesar de la presencia de actividad amilasa intestinal en algunos peces marinos, como en la dorada, la ausencia de actividad celulasa digestiva impide la degradación de la pared celular de las algas. La

degradación eficaz de la pared celular celulósica de las algas es un factor clave para mejorar la biodisponibilidad de nutrientes en animales monogástricos, sobre todo en peces. En consecuencia, parece recomendable incluir un pre-tratamiento de la biomasa algal que permita la ruptura o debilitamiento de la pared celular antes de usarla en la fabricación de los piensos.

5. Evaluación de las Algas en Piensos Acuícolas

Efecto sobre el crecimiento y la utilización de nutrientes

Los resultados obtenidos sobre el efecto de la inclusión de microalgas en la alimentación de peces son variados (Shah *et al.*, 2018; Roohani *et al.*, 2019; Walker y Berlinsky, 2011; Gong *et al.*, 2019). Las diferencias en la respuesta parecen estar influenciadas por varios factores, como la especie de pez y alga, el nivel de inclusión y la composición nutricional del alga (Shah *et al.*, 2018). Varias especies de microalgas, como *Tisochrysis lutea*, *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis gaditana*, *Arthrospira platensis* y *Scenedesmus almeriensis*, han sido evaluadas con éxito en diferentes peces de cultivo (Figura 5). La inclusión de *T. suecica* (5%) mejoró el rendimiento de crecimiento de los alevines de dorada (Vizcaíno *et al.*, 2016b). Asimismo, Vizcaíno *et al.* (2018) confirmaron que hasta un 15% de inclusión de microalgas en el pienso no causó efectos negativos en el crecimiento de los juveniles de lenguado senegaleses. El estudio de Perera *et al.* (2020) evaluó dos compuestos comerciales extraídos de microalgas, i) LB-GREENboost® (LBGb), y ii) LB-GUThealth® (LBGh) desarrollados por LifeBioencapsulation S.L. (Almería, España), incluidos al 0,5% y al 1% en piensos, y describe que a pesar de que el uso de estos aditivos algales no aumentaron el crecimiento de los peces, sí que tuvo un efecto significativo en la utilización de nutrientes, reduciéndose el índice de conversión alimenticia (FCR) (Perera *et al.*, 2020). En los estudios mencionados, la inclusión de microalgas no afectó la ingesta de alimento, aunque se ha descrito un comportamiento alimentario alterado y una disminución del consumo de alimento cuando se usan niveles de inclusión de algas más elevados (Dellaire *et al.*, 2007).

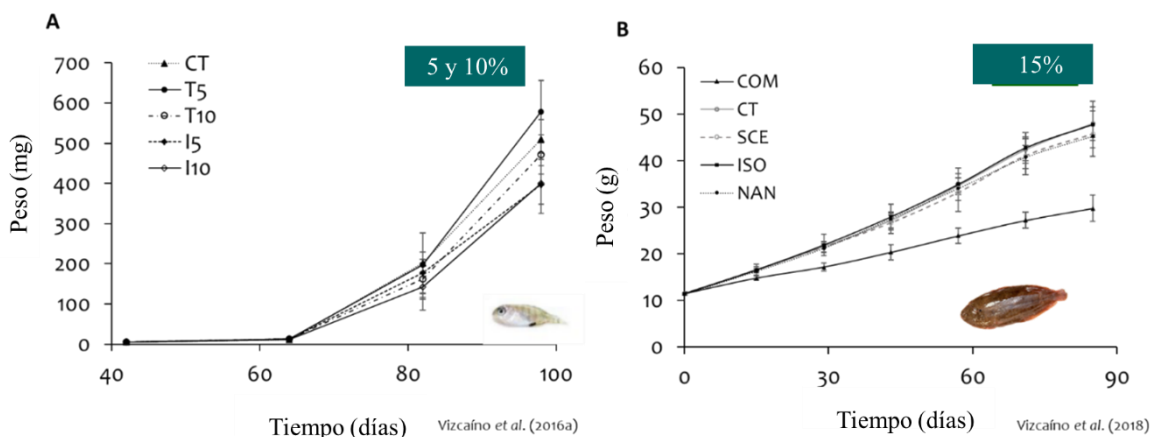


Figura 5. Ejemplos de los efectos de las dietas suplementadas con microalgas en el crecimiento de los peces. A) Alevines de dorada alimentados con un pienso control (CT), y *Tetraselmis suecica* (T5 y T10) e *Isochrysis galbana* (I5 y I10) incluidos al 5 y 10% en la dieta. B) Juveniles de lenguado senegalés alimentados con un pienso comercial (COM), control (CT), *Scenedesmus almeriensis* (SCE), *Isochrysis galbana* (ISO) y *Nannochloropsis gaditana* (NAN) al 15% de inclusión.

Del mismo modo, los efectos de las macroalgas en los peces parecen ser especie específicos y dependen de la proporción de biomasa utilizada. Se ha descrito que un bajo nivel de inclusión en el pienso ejerce efectos positivos sobre el crecimiento y la utilización de nutrientes (Vizcaíno *et al.*, 2016a; 2019a). Por el contrario, Valente *et al.* (2006) encontraron que la incorporación de un 10% de *Gracilaria cornea* afectó negativamente al crecimiento en *Dicentrarchus labrax*. Estos efectos perjudiciales se han atribuido a la posible existencia de factores antinutritivos, como ya describieron Vizcaíno *et al.* (2020), que podrían afectar a la biodisponibilidad y/o digestibilidad de los nutrientes. En este sentido, Vizcaíno *et al.* (2019a) encontraron que el valor de conversión del alimento (FCR) aumentó como resultado de incorporar un 5% de *Ulva onhoi* en dietas experimentales para juveniles de lenguado senegalés. Este hecho podría ser consecuencia del alto contenido en polisacáridos solubles e insolubles que acelerarían el tránsito del alimento por el tracto digestivo, lo que aumentaría la FCR, e incluso perjudicaría la tasa de crecimiento específico (Vizcaíno *et al.*, 2016a). Sin embargo, Moutinho *et al.* (2018) describieron que la alimentación de los peces con un 10% de *U. lactuca* durante 5 meses no causó ningún efecto detectable en el crecimiento (desde 23 g hasta 60 g de peso corporal) o la utilización del alimento en juveniles de lenguado senegalés. A la luz de los datos, la respuesta dispar descrita en la literatura después de la administración de *Ulva* podría estar relacionada con diferencias en factores como la madurez

fisiológica del pez, la especie concreta de *Ulva*, la duración de la prueba de alimentación e incluso el nivel de inclusión de las algas marinas.

Efecto sobre la composición proximal del músculo

En general, el uso de microalgas en piensos acuícolas produce efectos diferentes sobre la composición química de los peces. Así, mientras que Vizcaíno *et al.* (2014) encontraron que la inclusión de *Scenedesmus almeriensis*, hasta un 39%, en dietas para juveniles de dorada no afectó la composición corporal de los peces. Otros estudios mostraron que las microalgas pueden modificar el contenido de proteínas y lípidos en el hígado y músculo (Vizcaíno *et al.*, 2016b; Galafat *et al.*, 2020). Específicamente, en este último estudio se encontró que las microalgas disminuyen el contenido en lípidos musculares de alevines y juveniles de dorada. Resultados similares fueron descritos por Roohani *et al.* (2019), quienes describieron que *Spirulina platensis* aumentó el contenido de proteína y disminuyó el contenido de lípidos en juveniles de *Salmo trutta*. Estos autores señalaron que varios compuestos presentes en las algas, especialmente vitaminas, minerales, aminoácidos esenciales y ácidos grasos, podrían activar el metabolismo de los peces y, en particular, el uso de lípidos como fuente de energía, lo que ocasionaría una reducción de su acumulación a nivel tisular. En el caso de las macroalgas, Sáez *et al.* (2020) también describieron una reducción en el contenido de lípidos musculares en ejemplares de lenguado senegalés alimentados con dietas suplementadas con *Ulva onhoi* al 5%, y Ergün *et al.* (2009) describieron que los peces alimentados con dietas enriquecidas con *Ulva* mostraron un mayor contenido de proteína muscular. Estudios previos atribuyeron los efectos sobre el metabolismo de los lípidos y la acumulación de grasa muscular al alto contenido de vitamina C de *Ulva* (Ortiz *et al.*, 2006). De los estudios mencionados anteriormente, queda claro que la suplementación con algas es una estrategia interesante dirigida a modular la composición del músculo de pescado, lo que podría ser muy deseable en términos de calidad de los productos de la acuicultura.

Otra ventaja de la utilización de algas en la alimentación de los peces es que los animales generalmente reflejan en el músculo los perfiles de ácidos grasos de la dieta. De esta manera, la inclusión de biomasa de algas con un perfil de ácidos grasos apropiado puede producir un aumento significativo en el contenido de PUFAs n-3 en el filete. En cuanto a la modulación del contenido de ácidos grasos, García-Márquez *et al.* (2020) describieron una reducción de los niveles de ácidos grasos saturados en el músculo y un incremento de ARA, EPA y DHA en tilapias alimentadas,

durante un corto periodo (30 días), con dietas enriquecidas con *Scenedesmus almeriensis*. En este caso, la sustitución parcial de los ingredientes derivados del pescado, en un 25%, por *S. almeriensis*, y su administración en un período corto de tiempo representan una oportunidad para que los productores mejoren el valor nutricional del músculo en tilapia. En el lenguado senegalés, la suplementación del pienso con un 5% de *Ulva* también redujo el contenido de lípidos totales del músculo, y favoreció la retención selectiva de PUFAs n-3, especialmente los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) (Sáez *et al.*, 2020). Un efecto similar fue observado por Vizcaíno *et al.* (2016b) en alevines de dorada alimentados con piensos suplementados con bajo niveles de microalgas, mientras que la inclusión de *Tetraselmis suecica* aumentó significativamente la proporción de 18:3n-3, la adición de *Tisochrysis galbana* aumentó el contenido de DHA en los tejidos de los peces. Además, el uso de aceite de algas que contiene EPA y DHA fue eficaz para la sustitución total del aceite de pescado en peces marinos alimentados con piensos elaborados con un bajo nivel de harina de pescado (15%), y aseguró una calidad nutricional mejorada del filete, incrementándose el contenido de DHA (Carvalho *et al.*, 2020). Los resultados de los estudios anteriores indican claramente que las algas y sus derivados son útiles para proporcionar PUFAs n-3 en los piensos acuícolas, y que pueden contribuir a reducir el uso de aceite de pescado.

5.3. Los efectos sobre la funcionalidad intestinal

Uno de los aspectos más importantes relacionados con la inclusión de algas en el alimento es su efecto sobre la funcionalidad e integridad intestinal de los peces, dado que el crecimiento está directamente relacionado con los procesos de digestión y absorción de nutrientes (Vizcaíno *et al.*, 2019a). De hecho, una de las funciones clave del epitelio intestinal es completar las etapas finales de la digestión, así como absorber los nutrientes de la dieta. Un intestino sano ayuda a una mejor absorción para aumentar la biodisponibilidad de los nutrientes de los piensos mientras que también actúa como una barrera física para evitar la difusión de patógenos y toxinas desde la luz al interior de la mucosa. Una sola capa de células epiteliales separa el lumen intestinal del tejido estéril subyacente, y cualquier alteración en la integridad de la barrera activa fuertemente las células inmunes y causa inflamación crónica en los tejidos intestinales. Es por esto que la integridad de la mucosa intestinal es un factor clave en la nutrición de los peces.

Al respecto, diversos estudios realizados por Vizcaíno *et al.* (2014; 2016a; 2016b; 2018; 2019a) demostraron que la inclusión de algas induce cambios notables en la actividad de varias enzimas involucradas en los procesos de digestión y absorción intestinal. Las enzimas pancreáticas e intestinales del borde en cepillo están correlacionadas con el estado nutricional de los peces (Alarcón *et al.*, 1998). Por tanto, sus actividades se utilizan como indicadores de la capacidad digestiva y absorptiva de la mucosa intestinal en los peces. A la vista de estas consideraciones, en los estudios anteriormente referidos, la cuantificación de las actividades enzimáticas se diferenció en dos grupos; i) por un lado, las actividades proteasa alcalina total, tripsina y quimotripsina se utilizaron como indicadores de la capacidad digestiva para hidrolizar las proteínas de la dieta, y ii) por otro lado, las actividades leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina se utilizaron como indicadores de la capacidad de absorción intestinal. Los resultados obtenidos en dorada y lenguado senegalés mostraron ausencia de efectos negativos sobre la actividad de las enzimas de la secreción pancreática o sobre las enzimas del borde en cepillo; por el contrario, se observó un aumento de la actividad de las enzimas asociadas a la membrana del borde en cepillo debido a la inclusión de algunas microalgas (*Scenedesmus almeriensis*, *Tisochrysis lutea* o *Tetraselmis suecica*). Estas enzimas juegan un papel clave en las etapas finales de digestión de las proteínas de la dieta, permitiendo la absorción y el transporte de aminoácidos a través de los enterocitos. En particular, la fosfatasa alcalina es una enzima dominante en la mucosa intestinal y se usa comúnmente como indicador de la integridad intestinal y como marcador general de la absorción de nutrientes. Por esta razón, el aumento de estas actividades puede estar asociado con una mejora en la eficiencia general de los procesos de digestión y absorción. En cuanto al uso de piensos suplementados con algas, Vizcaíno *et al.* (2016; 2019a) describieron resultados contradictorios: mientras que *Ulva lactuca* provocó una disminución de la actividad proteolítica intestinal en dorada y en los juveniles de lenguado senegalés, el uso de *Ulva onhoi* aumentó la actividad de fosfatasa alcalina en lenguado senegalés. Una explicación de este efecto diferencial podría atribuirse a los diferentes niveles de inclusión utilizados en ambos experimentos. De esta forma, parece que un mayor nivel de inclusión determina una menor actividad proteolítica digestiva. En el caso de *Ulva* sp., Vizcaíno *et al.* (2019b) sugirieron su uso como aditivo para mejorar el epitelio intestinal del lenguado senegalés, pero solo durante un corto período de tiempo, con el fin de minimizar los efectos indeseables observados sobre las enzimas proteolíticas digestivas. En cualquier caso, un tracto gastrointestinal saludable también es crucial para un crecimiento óptimo del pez. Según Sweetman *et al.* (2008), el

estudio de la mucosa intestinal puede utilizarse como una valiosa herramienta para conocer cómo la dieta u otros factores, como enfermedades infecciosas o compuestos anti-nutricionales, pueden influir en su estructura y morfología. Una de las principales limitaciones del uso de proteínas de origen vegetal en los piensos acuícolas es su impacto sobre el sistema digestivo, incluida la reducción de la altura de las vellosidades y de los enterocitos, la disminución de la integridad del borde en cepillo y la vacuolización supranuclear en los enterocitos, la presencia de leucocitos en la *lamina propria* y submucosa, así como la presencia de diferentes signos de inflamación, entre otros (Cerezuela *et al.*, 2012). La microscopía óptica y electrónica son herramientas útiles para evaluar cómo las dietas suplementadas con algas afectan la integridad de la mucosa intestinal de los peces. Así, las imágenes obtenidas de microscopía electrónica de transmisión y barrido (TEM y SEM) de secciones intestinales de peces alimentados con dietas suplementadas con algas se han utilizado para evaluar la integridad del borde en cepillo apical. De esta forma, mientras que las imágenes TEM ofrecen información sobre la longitud, el diámetro y la superficie de absorción de las microvellosidades, las imágenes SEM permiten medir el área apical de los enterocitos. Los estudios realizados en peces marinos (dorada y lenguado senegalés) en diferentes estadios de desarrollo (alevines y juveniles) revelaron que la inclusión de algas generó cambios positivos en la longitud de las microvellosidades que incrementaron la superficie de absorción en los enterocitos (Vizcaíno *et al.*, 2014; 2016b; 2019a). En general, estos estudios revelaron un aumento general de la capacidad de absorción a nivel de intestino en peces alimentados con dietas suplementadas con microalgas.

6. Conclusiones

Las algas presentan un gran potencial para su uso en nutrición acuícola, no sólo por su composición nutricional, que las convierte en un prometedor recurso para tratar de disminuir la dependencia de las harinas y aceites de pescado, sino también por la presencia de una gran cantidad de compuestos bioactivos, que las hacen especialmente interesantes para su uso como ingrediente funcional, ya que existen numerosas evidencias de que mejoran la nutrición de los animales, su estado fisiológico, y posibilitan una producción acuícola sostenible. Sin embargo, a pesar de los continuos esfuerzos y de los efectos beneficiosos observados sobre distintos aspectos del crecimiento y el estado de condición general de los peces, aún existen ciertos aspectos en los que es necesario seguir avanzando para permitir un uso industrial generalizado de las algas en los

piensos de acuicultura, siendo la heterogeneidad en su composición química, su baja digestibilidad y su elevado coste, algunas de las principales limitaciones que deben de ser resueltas.

Agradecimientos

Parte de los resultados presentados han sido generados en el marco de los siguientes proyectos de investigación; SABANA (grant # 727874) financiado por el Programa de Investigación e Innovación Horizon 2020; AquaTech4Feed financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y “NextGenerationEU”/PRTR en el marco de la convocatoria ERA-NET BioBlue COFUND; DORALGAE (RTI2018-096625-B-C31) financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del Gobierno de España y los fondos FEDER; y el proyecto ALGADIET II financiado por el programa Pleamar de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico y el Fondo Europeo Marítimo y de Pesca.

Referencias bibliográficas

- Adams C, Godfrey V, Wahlen B, Seefeldt L & Bugbee B (2013) Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content trade off in oleaginous green microalgae. *Bioresource Technology* 131, 188–194. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.12.143
- Alarcón FJ, Díaz M, Moyano FJ & Abellán E (1998) Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry* 19, 257–267. DOI: 10.1023/A:1007717708491
- Arasaki S & Arasaki T (1983) Low calorie, high nutrition vegetables from the sea. To help you look and feel better. Japan Publications, Tokyo. Inc pp. (1), 6–196.
- Becker EW (1994) *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Becker E (2007) Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25, 207–210.
- Bernaerts TMM, Gheysen L, Kyomugasho C, Jamsazzadeh Kermani Z, Vandionant S, Foubert I, Hendrickx ME & Van Loey AM (2018) Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: Focus on the composition of cell wall related polysaccharides. *Algal Research* 32, 150–161. DOI: 10.1016/j.algal.2018.03.017
- Booman M, Forster I, Vederas JC, Groman DB & Jones SRM (2018) Soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) but not in pink salmon (*O. gorbuscha*). *Aquaculture* 483, 238–243. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.10.025
- Brown MR (2002) Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola* 3, 281–292.
- Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK & Dunstan GA (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315–331. DOI: 10.1016/S0044-8486(96)01501-3
- Canales-Gómez E, Correa G & Viana MT (2010) Effect of commercial carotene pigments (astaxanthin, cantaxanthin and β -carotene) in juvenile abalone *Haliotis rufescens* diets on the color of the shell of nacre. *Veterinaria Mexico* 41, 191–200.
- Cardoso C, Ripol A, Afonso C, Freire M, Varela J, Quental-Ferreira H, Pousão-Ferreira P & Bandarra N (2017) Fatty acid profiles of the main lipid classes of green seaweeds from fishpond aquaculture. *Food Science and Nutrition* 5(6), 1186–1194. DOI: 10.1002/fsn3.511
- Carvalho M, Montero D, Rosenlund G, Fontanillas R, Ginés R & Izquierdo M (2020) Effective complete replacement of fish oil by combining poultry and microalgae oils in practical diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings. *Aquaculture* 529, 735696. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735696
- Cerezuela R, Fumanal M, Tapia-Paniagua ST, Meseguer J, Morriño MA & Esteban MA (2012) Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. *Cell Tissue Research* 350, 477–489. DOI: 10.1007/s00441-012-1495-4
- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3), 294–306. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001

- Cian RE, Martínez-Augustin O & Drago SR (2012) Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. *Food Research International* 49, 364–372. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.07.003
- Cruz-Suárez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Guajardo-Barbosa C & Ricque-Marie D (2009) Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. *Aquaculture Nutrition* 15, 421–430. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2008.00607.x
- Cuellar-Bermudez SP, Aguilar-Hernandez I, Cardenas-Chavez DL, Ornelas-Soto N, Romero-Ogawa MA & Parra-Saldivar R (2015) Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbiology Biotechnology* 8, 190–209. DOI: 10.1111/1751-7915.12167
- Dallaire V, Lessard P, Vandenberg G & de la Noüe J (2007) Effect of algal incorporation on growth, survival and carcass composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Bioresource Technology* 98, 1433–1439. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.05.043
- Daniel N (2018) A review on replacing fishmeal in aqua feeds using plant protein sources. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 6(2), 164–179.
- Del Campo JA, Rodríguez H, Moreno J, Vargas MA, Rivas J & Guerrero MG (2004) Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 848–854. DOI: 10.1007/s00253-003-1510-5
- Di Lena G, Casini I, Lucarini M, del Pulgar JS, Aguzzi A, Caproni R, Gabrielli P & Lombardi-Boccia G (2020) Chemical characterization and nutritional evaluation of microalgal biomass from large-scale production: a comparative study of five species. *European Food Research and Technology* 246(2), 323–332. DOI: 10.1007/s00217-019-03346-5
- Diken G, Demir O & Naz M (2016) The inhibitory effects of different diets on the protease activities of *Argyrosomus regius* (Pisces, Scianidae) larvae as a potential candidate species. *Journal of Applied Animal Research* 46(1), 1–6. DOI: 10.1080/09712119.2016.1263200
- Dunstan GA, Volkman JK, Jeffrey SW & Barrett SM (1992) Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 2. Lipid classes and fatty acids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 161(1), 115–134. DOI: 10.1016/0022-0981(92)90193-E
- Enzing C, Ploeg M & Barbosa M (2014) Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. IPTS Inst.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2011) Guidance on the assessment of microbial biomasses for use in animal nutrition. *EFSA Journal* 9(3), 2117
- Ergün S, Soyutürk M, Güroy B, Güroy D & Merrifield, D (2009) Influence of *Ulva* meal on growth, feed utilization, and body composition of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at two levels of dietary lipid. *Aquaculture International* 17(4), 355. DOI: 10.1007/s10499-008-9207-5
- FAO (2020) The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>

- Galafat A, Vizcaíno AJ, Sáez MI, Martínez TF, Jerez-Cepa I, Mancera JM & Alarcón FJ (2020) Evaluation of *Arthrospira* sp. enzyme hydrolysate as dietary additive in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Journal of Applied Phycology* 32, 3089–3100. DOI: 10.1007/s10811-020-02141-0
- Galland-Irmouli AV, Fleurence J, Lamghari R, Luçon M, Rouxel C, Barbaroux O, Bronowicki JP, Villaume C & Gueant JL (1999) Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (dulse). *The Journal of Nutritional Biochemistry* 10, 353–359. DOI: 10.1016/s0955-2863(99)00014-5
- García-Márquez J, Rico RM, Sánchez-Saavedra MDP, Gómez-Pinchetti JL, Acién FG, Figueroa FL, Alarcón FJ, Moriñigo MA & Abdala-Díaz RT (2020) A short pulse of dietary algae boosts immune response and modulates fatty acid composition in juvenile *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research* 51, 4397–4409. DOI: 10.1111/are.14781
- Gong Y, Bandara T, Huntley M, Johnson ZI, Dias J, Dahle D, Sørensen M & Kiron V (2019) Microalgae *Scenedesmus* sp. as a potential ingredient in low fishmeal diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 501, 455–464. DOI: 10.1016/J.AQUACULTURE.2018.11.049
- Gora AH, Ambasankar K, Sandeep KP, Rehman S, Agarwal D, Ahmad L & Ramachandran K (2019) Effect of dietary supplementation of crude microalgal extracts on growth performance, survival and disease resistance of *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) larvae. *Indian Journal of Fisheries* 66, 64–72. DOI: 10.21077/ijf.2019.66.1.79076-09
- Gressler V, Yokoya NS, Fujii MT, Colepicolo P, Mancini Filho J, Torres RP & Pinto E (2010) Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chemistry* 120(2), 585–590. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.10.028
- Haas S, Bauer JL, Adakli A, Meyer S, Lippemeier S, Schwarz K & Schulz C (2016) Marine microalgae *Pavlova viridis* and *Nannochloropsis* sp. as n-3 PUFA source in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Applied Phycology* 28, 1011. DOI: 10.1007/s10811-015-0622-5
- Hajiahmadian M, Vajargah MF, Farsani HG & Chorchchi MM (2012) Effect of *Spirulina platensis* meal as feed additive on growth performance and survival rate in golden barb fish, *Puntius gelius* (Hamilton, 1822). *Journal of Fisheries International* 7, 61–64. DOI: 10.3923/jfish.2012.61.64
- Ivanova V, Stancheva M & Petrova D (2013) Fatty acid composition of black sea *Ulva rigida* and *Cystoseira crinita*. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 19(S1), 42–47.
- Joubert Y & Fleurence J (2008) Simultaneous extraction of proteins and DNA by an enzymatic treatment of the cell wall of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 20, 55–61. DOI: 10.1007/s10811-007-9180-9
- Kent M, Welladsen HM, Mangott A & Li Y (2015) Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements. *PloS One* 10, 2. DOI: 10.1371/journal.pone.0118985
- Kiron V, Sørensen M, Huntley M, Vasanth GK, Gong Y, Dahle D & Paliawadana AM (2016) Defatted biomass of the microalga, *Desmodesmus* sp., can replace fishmeal in the feeds for Atlantic salmon. *Frontiers in Marine Science* 3, 67. DOI: 10.3389/fmars.2016.00067

- Kousoulaki K, Østbye TKK, Krasnov A, Torgersen JS, Mørkøre T & Sweetman J (2015) Metabolism, health and fillet nutritional quality in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing n-3-rich microalgae. *Journal of Nutritional Science*, 4, e24. DOI: 10.1017/jns.2015.14
- Kovač DJ, Simeunović JB, Babić OB, Mišan AC & Milovanović IL (2013) Algae in food and feed. *Food and Feed Research* 40(1), 21–31. DOI: 10.2791/3339
- Lers A, Biener Y & Zamir A (1990) Photoinduction of massive beta-carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*: kinetics and dependence on gene activation. *Plant Physiology* 93, 389–95. DOI: 10.1104/pp.93.2.389
- Liu C, Liu H, Han D, Xie S, Jin J, Yang Y & Zhu X. (2020) Effects of dietary *Arthrospira platensis* supplementation on the growth performance, antioxidation and immune related-gene expression in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture Reports* 17, 100297. DOI: 10.1016/j.aqrep.2020.100297
- López CV, Cerón MC, Acién FG, Segovia C, Chisti Y & Fernández JM (2010) Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology* 101, 7587–7591. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.04.077
- Mæhre HK (2015) Seaweed proteins—how to get to them? Effects of processing on nutritional value, bioaccessibility and extractability. Tesis Doctoral. Norwegian College of Fishery Science, Faculty of Biosciences, Fisheries and Economics. The Arctic University of Norway.
- Mai K, Wan J, Ai Q, Xu W, Liufu Z, Zhang L, Zhang C & Li H (2006a) Dietary methionine requirement of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. *Aquaculture* 253(1-4), 564–572. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.08.010
- Mai K, Zhang L, Ai Q, Duan Q, Zhang C, Li H, Wan J & Liufu Z (2006b) Dietary lysine requirement of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture* 258(1-4), 535–542. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.04.043
- Marrion O, Schwertz A, Fleurence J, Gueant JL & Villaume C (2003) Improvement of the digestibility of the proteins of the red alga *Palmaria palmata* by physical processes and fermentation. *Molecular Nutrition Food Research* 47, 339–344. DOI: 10.1002/food.200390078
- Marsham S, Scott GW & Tobin ML (2007) Comparison of nutritive chemistry of a range of temperate seaweeds. *Food Chemistry* 100, 1331–1336. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.11.029
- McDermid KJ & Stuercke B. (2003) Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 15, 513–524. DOI: 10.1023/B:JAPH.0000004345.31686.7f
- Molino A, Iovine A, Casella P, Mehariya S, Chianese S, Cerbone A, Rimauro J & Musmarra D (2018) Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15(11), 2436. DOI: 10.3390/ijerph15112436
- Mourente G, Lubian LM & Odriozola JM (1990) Total fatty acid composition as a taxonomic index of some marine microalgae used as food in marine aquaculture. *Hydrobiologia* 203(3), 147–154. DOI: 10.1007/BF00005683
- Moutinho S, Linares F, Rodriguez JL, Vera Sousa & Valente LMP (2018) Inclusion of 10% seaweed meal in diets for juvenile and on-growing life stages of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Applied Phycology* 30(6), 3589–3601. DOI: 10.1007/s10811-018-1482-6

- Nakagawa K, Kiko T, Miyazawa T, Burdeos GC, Kimura F, Satoh A & Miyazawa T (2011) Antioxidant effect of astaxanthin on phospholipid peroxidation in human erythrocytes. *British Journal of Nutrition* 105(11), 1563–1571. DOI: 10.1017/S0007114510005398
- Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, Chiu A, Elliott M, Farrell AP, Forster I, Gatlin DM, Goldberg RJ, Hua K & Nichols PD (2009) Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(36), 15103–15110. DOI: 10.1073/pnas.0905235106
- Norsker NH, Barbosa MJ, Vermuë MH & Wijffels RH (2011) Microalgal production – a close look at the economics. *Biotechnology Advances* 29, 24–27. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.08.005
- Oliveira MN, Ponte-Freitas AL, Urano-Carvalho AF, Taveres-Sampaio TM, Farias DF, Alves-Teixeira DI, Gouveia ST, Gomes-Pereira J & Castro-Catanho de Sena MM (2009) Nutritive and non-nutritive attributes of washed-up seaweeds from the coast of Ceará, Brazil. *Food Chemistry* 11, 254–259. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.12.004
- Ortiz J, Romero N & Robert P (2006) Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chemistry* 99(1), 98–104. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.07.027
- Percival EE & Turvey JR (1974) Polysaccharides of algae. CRC, handbook of microbiology, condensed edition, 532nd ed, ed. AL Laskin, and HA Lechevalier. Cleveland: CRC Press Inc.
- Perera E, Sánchez-Ruiz D, Sáez MI, Galafat A, Barany A, Fernández-Castro M, Vizcaíno AJ, Fuentes J, Martínez TF, Mancera JM, Alarcón FJ & Martos-Sitcha JA (2020) Low dietary inclusion of nutraceuticals from microalgae improves feed efficiency and modifies intermediary metabolisms in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Scientific Report* 10, 18676. DOI: 10.1038/s41598-020-75693-3
- Pereira H, Sardinha M, Santos T, Gouveia L, Barreira L, Dias J & Varela J (2020) Incorporation of defatted microalgal biomass (*Tetraselmis* sp. CTP4) at the expense of soybean meal as a feed ingredient for juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Algal Research* 47, 101869. DOI: 10.1016/j.algal.2020.101869
- Prabhu KS, Siveen KS, Kuttikrishnan S, Iskandarani A, Tsakou M, Achkar IW, Therachiyil L, Krishnankutty R, Parray A, Kulinski M, Merhi M, Dermime S, Mohammad RM & Uddin S (2017) Targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein and PI3-kinase/AKT signaling by embelin suppresses growth of leukemic cells. *PLoS One* 12, e0180895. DOI: 10.1371/journal.pone.0180895
- Pratoomyot J, Srivilas P & Noiraksar T (2005) Fatty acids composition of 10 microalgal species. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 27(6), 1179–1187.
- Rahimnejad S, Lee SM, Park HG & Choi J (2017) Effects of dietary inclusion of *Chlorella vulgaris* on growth, blood biochemical parameters, and antioxidant enzyme activity in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 48(1), 103–112. DOI: 10.1111/jwas.12320
- Ren LJ, Ji XJ, Huang H., Qu L., Feng Y., Tong Q.Q. & Ouyang P.K. (2010) Development of a stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(5), 1649–1656. DOI: 10.1007/s00253-010-2639-7

- Rincón DD, Velásquez HA, Dávila MJ, Semprun AM, Morales ED & Hernández JL (2012) Substitution levels of fishmeal by *Arthrospira (Spirulina) maxima* meal in experimental diets for red tilapia fingerlings (*Oreochromis sp.*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 25(3), 430–437.
- Roohani AM, Kenari AA, Kapoorchali MF, Borani MS, Zorriehzahra MJ, Smiley AH, Esmaili M & Rombenso AN (2019) Effect of spirulina *Spirulina platensis* as a complementary ingredient to reduce dietary fishmeal on the growth performance, whole-body composition, fatty acid and amino acid profiles, and pigmentation of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) juveniles. *Aquaculture Nutrition* 25, 633–645. DOI: 10.1111/anu.12885
- Roy SS & Pal S (2015) Microalgae in aquaculture: a review with special emphasis to nutritional value and fish dietetics. *Proceedings of the Zoological Society* 68, 1–8. DOI: 10.1007/s12595-013-0089-9
- Sáez MI, Martínez TF & Alarcón FJ (2013) Effect of the dietary of seaweeds on intestinal proteolytic activity of juvenile sea bream, *Sparus aurata*. *International Aquafeed* 16(2), 38–40.
- Sáez MI, Vizcaíno A, Galafat A, Anguís V, Fernández-Díaz C, Balebona MC, Alarcón FJ & Martínez TF (2020) Assessment of long-term effects of the macroalgae *Ulva ohnoi* included in diets on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fillet quality. *Algal Research* 47, 101885. DOI: 10.1016/j.algal.2020.101885
- Sahu A, Pancha I, Jain D, Paliwal C, Ghosh T, Patidar S, Bhattacharya S & Mishra S (2013) Fatty acids as biomarkers of microalgae. *Phytochemistry* 89, 53–58. DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.02.001
- Sales R, Cerón-García MC, Navarro-López E, González-López C, Tsuzuki MY, Ación-Fernández FG, Alarcón FJ & Molina-Grima E (2020) Processing *Nannochloropsis gaditana* biomass for the extraction of high-value biocompounds. *Journal of Applied Phycology* 32, 3113–3122. DOI: 10.1007/s10811-020-02156-7
- Sánchez JF, Fernández JM, Ación FG, Rueda A, Pérez-Parra J & Molina E (2008) Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry* 43, 398–405. DOI: 10.1016/j.procbio.2008.01.004
- Santigosa E, Sáez de Rodrigáñez MA, Rodiles A, García-Barroso F & Alarcón FJ (2010) Effect of diets containing a purified soybean trypsin inhibitor on growth performance, digestive proteases and intestinal histology in juvenile sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research* 41, e187–e198. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2010.02500.x
- Sarker PK, Gamble MM, Kelson S & Kapuscinski AR (2016) Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium* sp. and of protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina* sp. feed ingredients. *Aquaculture Nutrition* 22(1), 109–119. DOI: 10.1111/anu.12230
- Servel MO, Claire C, Derrien A, Coiffard L & De Roeck-Holtzhauer Y (1994) Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry* 36(3), 691–693. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)89798-8
- Shah MMR, Liang Y, Cheng JJ & Daroch M (2016) Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science* 7, 531. DOI: 10.3389/fpls.2016.00531
- Shah MR, Lutz GA, Alam A, Sarker P, Chowdhury MK, Parsaeimehr A, Liang Y & Daroch M (2018) Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology* 30(1), 197–213. DOI: 10.1007/s10811-017-1234-z

- Shi X, Luo Z, Chen F, Wei CC, Wu K, Zhu XM & Liu X (2017) Effect of fish meal replacement by *Chlorella* meal with dietary cellulase addition on growth performance, digestive enzymatic activities, histology and myogenic genes' expression for crucian carp *Carassius auratus*. *Aquaculture Research* 48, 3244–3256. DOI: 10.1111/are.13154
- Shields RJ & Lupatsch I (2012) Algae for aquaculture and animal feeds. *TATuP-Zeitschrift für Technikfolgenabschätzung in Theorie und Praxis* 21, 23–37. DOI: 10.14512/tatup.21.1.23
- Shuuluka D, Bolton JJ & Anderson RJ (2013) Protein content, amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors of *Ulva rigida* and *Ulva capensis* from natural populations and *Ulva lactuca* from an aquaculture system, in South Africa. *Journal of Applied Phycology* 25(2), 677–685. DOI: 10.1007/s10811-012-9902-5
- Silva DM, Valente LMP, Sousa-Pinto I, Pereira R, Pires MA, Seixas F & Rema P (2015) Evaluation of IMTA-produced seaweeds (*Gracilaria*, *Porphyra*, and *Ulva*) as dietary ingredients in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., juveniles. Effects on growth performance and gut histology. *Journal of Applied Phycology* 27, 1671–1680. DOI: 10.1007/s10811-014-0453-9
- Slocombe SP, Ross M, Thomas N, McNeill S & Stanley MS (2013) A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource Technology* 129, 51–57. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.163
- Sørensen M, Berge GM, Reitan KI & Ruyter B (2016) Microalga *Phaeodactylum tricorutum* in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*) –Effect on nutrient digestibility, growth and utilization of feed. *Aquaculture* 460, 116–123. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.04.010
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E & Isambert A (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101, 87–96. DOI: 10.1263/jbb.101.87
- Sweetman J, Dimitroglou A, Davies S & Torrecillas S (2008) Gut morphology: a key to efficient nutrition. *International Aquafeed* 11, 26–30.
- Tchorbanov B & Bozhkova M (1988) Enzymatic hydrolysis of cell protein in green algae *Chlorella* and *Scenedesmus* after extraction with organic solvents. *Enzyme Microbiology Technology* 10, 233–238. DOI: 10.1016/0141-0229(88)90072-5
- Teimouri M, Amirkolaie AK & Yeganeh S (2013) The effects of *Spirulina platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 396-399, 14–19. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.02.009
- Teuling E, Wierenga PA, Agboola JO, Gruppen H & Schrama JW (2019) Cell wall disruption increases bioavailability of *Nannochloropsis gaditana* nutrients for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 499, 269–282. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.09.047
- Tibaldi E, Chini Zittelli G, Parisi G, Bruno M, Giorgi G, Tulli F, Venturini S, Tredici MR & Poli BM (2015) Growth performance and quality traits of European seabass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis* sp. (T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. *Aquaculture* 440, 60–68. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.02.002

- Tibbetts SM, Milley JE & Lall SP (2015) Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology* 27, 1109–1119. DOI: 10.1007/s10811-014-0428-x
- Tibbetts SM, MacPherson T, McGinn PJ & Fredeen AH (2016) *In vitro* digestion of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for monogastric and ruminant animal feed applications. *Algal Research* 19, 324–332. DOI: 10.1016/j.algal.2016.01.016
- Tibbetts SM, Yasumaru F & Lemos D (2017) *In vitro* prediction of digestible protein content of marine microalgae (*Nannochloropsis granulata*) meals for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Algal Research* 21, 76–80. DOI: 10.1016/j.algal.2016.11.010
- Tibbetts SM (2018) The potential for ‘next-generation’, microalgae-based feed ingredients for salmonid aquaculture in context of the blue revolution. In *Microalgal Biotechnology* (pp. 151–175). IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.73551
- Tolasa S, Cakli S & Ostermeyer U (2005) Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid. *European Food Research and Technology* 221(6), 787–791. DOI: 10.1007/s00217-005-0071-5
- Tulli F, Chini Zittelli G, Giorgi G, Poli BM, Tibaldi E & Tredici MR (2012) Effect of the inclusion of dried *Tetraselmis suecica* on growth, feed utilization, and fillet composition of European sea bass juveniles fed organic diets. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 21, 188–197. DOI: 10.1080/10498850.2012.664803
- Valente LMP, Custódio M, Batista S, Fernandes H & Kiron V (2019) Defatted microalgae (*Nannochloropsis* sp.) from biorefinery as a potential feed protein source to replace fishmeal in European sea bass diets. *Fish Physiology and Biochemistry* 45(3), 1067–1081. DOI: 10.1007/s10695-019-00621-w
- Valente LMP, Gouveia A, Rema P, Matos J, Gomes EF & Pinto IS (2006) Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 252, 85–91. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.11.052
- Venkataraman LV & Becker EW (1985) Biotechnology and utilization of algae: the Indian experience. Department of Science & Technology and Central Food Technological Research Institute, Mysore, India.
- Vizcaíno AJ, López G, Sáez MI, Jiménez JA, Barros A, Hidalgo L, Camacho-Rodríguez J, Martínez TF, Cerón-García MC & Alarcón FJ (2014) Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture* 431, 34–43. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.05.010
- Vizcaíno AJ, Mendes SI, Varela JL, Ruiz-Jarabo I, Rico R, Figueroa FL, Abdala R, Moriñigo MA, Mancera JM & Alarcón FJ (2016a) Growth, tissue metabolites and digestive functionality in *Sparus aurata* juveniles fed different levels of macroalgae, *Gracilaria cornea* and *Ulva rigida*. *Aquaculture Research* 47(10), 3224–3238. DOI: 10.1111/are.12774
- Vizcaíno AJ, Saéz MI, López G, Arizcun M, Abellán E, Martínez TF & Alarcón FJ (2016b) *Tetraselmis suecica* and *Tisochrysis lutea* meal as dietary ingredients for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fry. *Journal of Applied Phycology* 28(5), 2843–2855. DOI: 10.1007/s10811-016-0845-0
- Vizcaíno AJ, Rodiles A, López G, Sáez MI, Herrera M, Hachero I, Martínez TF, Cerón-García MC & Alarcón FJ (2018) Growth performance, body composition, and digestive functionality of Senegalese sole (*Solea*

- senegalensis* Kaup, 1858) juveniles fed diets including microalgae freeze-dried biomass. *Fish Physiology and Biochemistry* 44(2), 661–677. DOI: 10.1007/s10695-018-0462-8
- Vizcaíno AJ, Fumanal M, Sáez MI, Martínez TF, Moriñigo MA, Fernández-Díaz, C, Anguís V, Balebona MC & Alarcón FJ (2019a) Evaluation of *Ulva ohnoi* as functional dietary ingredient in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Effects on the structure and functionality of the intestinal mucosa. *Algal Research* 42, 101608. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101608
- Vizcaíno AJ, Sáez MI, Martínez TF, Ación FG & Alarcón FJ (2019b) Differential hydrolysis of proteins of four microalgae by the digestive enzymes of gilthead sea bream and Senegalese sole. *Algal Research* 37, 145–153. DOI: 10.1016/j.algal.2018.11.018
- Vizcaíno AJ, Galafat A, Sáez MI, Martínez TF & Alarcón FJ (2020) Partial characterization of protease inhibitors of *Ulva ohnoi* and their effect on digestive proteases of marine fish. *Marine Drugs* 18(6), 319. DOI: 10.3390/md18060319
- Volkman JK, Jeffrey SW, Nichols PD, Rogers GI & Garland CD (1989) Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in aquaculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 128(3), 219–240. DOI: 10.1016/0022-0981(89)90029-4
- Walker AB & Berlinsky DL (2011) Effects of partial replacement of fishmeal protein by microalgae on growth, feed intake, and body composition of Atlantic cod. *North American Journal of Aquaculture* 73, 76–83. DOI: 10.1080/15222055.2010.549030
- Wan AHL, Simon JD, Soler-Vila A, Fitzgerald R & Johnson MP (2019) Macroalgae as a sustainable aquafeed ingredient. *Reviews in Aquaculture* 11(3), 458–492. DOI: 10.1111/raq.12241
- Wang C, Hu W, Wang L, Qiao H, Wu H & Xu Z (2019) Effects of dietary supplementation with *Sargassum horneri* meal on growth performance, body composition, and immune response of juvenile turbot. *Journal of Applied Phycology* 31(1), 771–778. DOI: 10.1007/s10811-018-1590-3
- Wilson RP (2003) Amino acids and proteins. In *Fish Nutrition* (pp. 143–179). Academic Press.
- Xu S, Zhang L, Wu Q, Liu X, Wang S, You C & Li Y (2011) Evaluation of dried seaweed *Gracilaria lemaneiformis* as an ingredient in diets for teleost fish *Siganus canaliculatus*. *Aquaculture International* 19, 1007–1018. DOI: 10.1007/s10499-011-9418-z
- Yadav G, Meena DK, Sahoo AK, Das BK & Sen R (2020) Effective valorization of microalgal biomass for the production of nutritional fish-feed supplements. *Journal of Cleaner Production* 243, 118697. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.118697
- Yarnold J, Karan H, Oey M & Hankamer B (2019) Microalgal aquafeeds as part of a circular bioeconomy. *Trends in Plant Science* 24(10), 959–970. DOI: 10.1016/j.tplants.2019.06.005

Estrategias Nutricionales y Productos de soya para la Alimentación de Juveniles de Róbalo blanco del pacífico (*Centropomus viridis*): hacia la Rentabilidad de su Cultivo

Crisantema Hernández*, Cynthia Esmeralda Lizárraga Velázquez, Erika Yazmín Sánchez Gutiérrez y Daniela Arriaga-Hernández

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Unidad Mazatlán.

Av. Sábalos Cerritos S/N C.P. 82112, Mazatlán, Sinaloa, México

Laboratorio de Nutrición Acuicola y Planta de alimentos

E-mail: *chernandez@ciad.mx

Resumen

El robalo blanco es una especie con alto requerimiento proteico y limitada capacidad para digerir proteínas vegetales, lo que plantea desafíos en el diseño de alimentos que aseguren el éxito del cultivo comercial del robalo. El objetivo fue desarrollar alimentos nutricionalmente balanceados con sustitución de proteína marina por proteína vegetal, y alimentos funcionales, que garanticen el óptimo crecimiento del robalo. Se evaluó el efecto de la sustitución dietética parcial de proteína de harina de pescado, por proteína de harina de soya, así como la inclusión de quitosano (aditivo funcional) sobre el crecimiento, la eficiencia alimenticia, y la capacidad digestiva en robalo. La sustitución hasta un 45% de proteína de harina de pescado con proteína de harina de soya no afecta el crecimiento de robalo en comparación con el control. La sustitución del 45% de proteína de harina de pescado con proteína de concentrado de proteína de soya reduce el crecimiento de robalo. Los robalos alimentados con las dietas con harina de soya mostraron una tasa de conversión alimenticia más baja que los peces alimentados con concentrado de proteína de soya. Además, se observó que la sustitución del 45% de la proteína la harina de pescado con la proteína de concentrado de proteína de soya, reduce las actividades de proteasas alcalinas. Por otra parte, se reportó que la inclusión de quitosano en dietas con alto contenido de soya, incrementa el crecimiento y mejora la eficiencia alimenticia de robalo en comparación con el control. En conclusión, la harina de soya puede utilizarse con éxito para reemplazar a la harina de pescado en los alimentos para el robalo blanco y el quitosano puede usarse como un aditivo potenciador del crecimiento.

Palabras clave: *Acuicultura, proteína vegetal, peces marinos*

El róbalo blanco, *Centropomus viridis*, es un pez marino que se distribuye desde Baja California Sur y el golfo de California hasta el sur de Ecuador y las islas Galápagos (Fischer *et al.*, 1995), los robalos en general presentan los mejores atributos como especies emergentes para la acuicultura marina en México, presentan un alto valor comercial debido a la calidad y el sabor de su carne. Sin embargo, la pesca comercial y deportiva, entre otras presiones antrópicas, han provocado la disminución de sus poblaciones naturales (Labastida-Che *et al.*, 2013). La disminución de la oferta, a su vez, ha aumentado su demanda y precio de mercado. Por ello, existe un interés creciente por desarrollar sistemas para la producción controlada de *C. viridis* (Ibarra-Castro *et al.*, 2017). Sin embargo, los hábitos carnívoros de esta especie (Macal-López *et al.*, 2013), sus altos requerimientos proteicos (Concha-Frías *et al.*, 2018) y la limitada capacidad de los peces centropómidos para digerir proteínas vegetales (Lemus *et al.*, 2018) plantean desafíos significativos en el diseño de alimentos eficientes y económicos adaptados a los requerimientos nutricionales del róbalo en cultivo, con el objeto de conseguir una alta producción, en corto tiempo y al mínimo costo.

La Planta piloto de producción de peces de CIAD Mazatlán, ha logrado la producción exitosa de róbalo blanco *Centropomus viridis* (Ibarra-Castro *et al.*, 2017), lo que ha permitido la realización de estudios a escala piloto sobre la optimización de la tasa de crecimiento de esta especie. Estudios recientes evaluaron la viabilidad técnica y económica del cultivo del róbalo blanco o “white snook” (en inglés) en estanques y/o jaulas flotantes (común pers. De Maricultura del Pacifico, S.A., de C.V; Giovanni *et al.*, 2022), lo cual ha sido fundamental para definir las estrategias de cultivo en ambos sistemas, así como los factores principales relacionados con la viabilidad del cultivo de róbalo blanco (factores biológicos: supervivencia, tasa de crecimiento y tasa de conversión alimenticia; factores financieros: precio de venta final, costo de alimentación y precio del juvenil). Por otra parte, los resultados de especies marinas como el robalo y el pargo (*L. guttatus*) han demostrado que para la selección del sitio de cultivo se debe priorizar las áreas con una latitud tropical-subtropical, en las cuales, la temperatura del agua oscile entre 26 y 32 °C, como una estrategia para promover mejores tasas de crecimiento y supervivencia durante la etapa inicial y las condiciones de crianza para ambas especies.

En la industria del cultivo de peces marinos, el costo operacional más alto es la alimentación, por lo que diseño y balance de un alimento específico para el robalo es uno de los aspectos primordiales para el éxito de su cultivo comercial.

El róbalo blanco es una especie de hábitos carnívoros que demanda alto contenido de proteína dietética, lo cual encarece el desarrollo de alimentos para esta especie, ya que la harina de pescado (HP) es la principal fuente de proteína con un costo relativamente alto. Sin embargo, el uso de ingredientes regionales de origen vegetal, así como la aplicación de estrategias nutricionales y tecnológicas (biotransformación de ingredientes a través de procesos de fermentación, subproductos pesqueros hidrolizados entre otros) permitirá lograr el reemplazo de la HP, considerado el ingrediente clave en especies carnívoras, y, en consecuencia, la reducción del costo del alimento para róbalo blanco. En el laboratorio de nutrición de CIAD Mazatlán, se dirigen los esfuerzos en esta línea y se ha conseguido en primera instancia desarrollar un alimento con sustitución parcial de la proteína de la HP por la harina de soya.

La soya es un ingrediente que actualmente se usa para reemplazar a la HP en alimentos acuícolas. Esta fuente de proteína es relativamente económica, fácilmente disponible y de alto valor nutricional, con un perfil equilibrado de aminoácidos (Krishnan y Jez, 2018). No obstante, se ha demostrado que alimentar a peces carnívoros con soya, particularmente en alto niveles dietarios, puede afectar negativamente su crecimiento, eficiencia alimenticia y salud intestinal (Herman y Schmidt, 2016; Krogdahl *et al.*, 2020). Esto se debe, al menos en parte, a una deficiencia de aminoácidos (metionina + cisteína) que contienen azufre (Krishnan y Jez, 2018) y a la presencia de factores antinutricionales (inhibidores de la proteasa, fitatos, saponinas, lectinas, oligosacáridos, fitoestrógenos, antivitaminas) en la soya.

Arriaga-Hernández *et al.* (2020) evaluó el efecto de la sustitución dietética parcial de proteína de HP (15%, 30% y 45%), por proteína de harina de soya (HS) o proteína de concentrado de proteína de soya (CPS) sobre el crecimiento, la utilización del alimento, la digestibilidad aparente y la capacidad digestiva en juveniles de róbalo blanco, *Centropomus viridis*. Al respecto, se demostró que la sustitución dietética hasta un 45% de proteína de HP con proteína de HS no afecta el crecimiento de róbalo blanco en comparación con el grupo control. Contrariamente, la sustitución dietética del 45% de proteína de HP con proteína de CPS reduce significativamente el crecimiento de los peces. Los peces alimentados con las dietas con HS mostraron una relación de eficiencia proteica más alta y una tasa de conversión alimenticia más baja que los peces alimentados con las dietas con CPS. El contenido de grasa corporal de los peces alimentados con las dietas con HS y CPS fue mayor que en los peces alimentados con la dieta control. Por otro lado, se observó que la sustitución del 15% de HP con CPS reduce la actividad de pepsina, mientras que

la sustitución del 30% y 45% de HP con HS y CPS, respectivamente, reducen las actividades de α -amilasa intestinal y proteasas alcalinas totales en los ciegos pilóricos de róbalo blanco, en comparación con el grupo control. Los resultados de las actividades de enzimas digestivas son consistentes con los resultados obtenidos del análisis de digestibilidad aparente, donde los coeficientes de digestibilidad fueron más altos en los peces alimentados con las dietas con inclusión de soya que en aquellos alimentados con la dieta control. En conclusión, la HS puede utilizarse con éxito para reemplazar a la HP en los alimentos acuícolas para el róbalo blanco, sin afectar su crecimiento y su capacidad digestiva, es decir, el róbalo blanco puede adaptarse al consumo de alimentos basados en proteínas de plantas en condiciones de acuicultura, no obstante, se requieren nuevos diseños de alimentos para potenciar el crecimiento de la especie cuando es alimentada con dietas con alto contenido de proteínas vegetales, esto debido a que se ha reportado que el consumo prolongado de harina de soya causa problemas en la anatomía y el funcionamiento gastrointestinal de peces (Krogdahl *et al.*, 2015), lo que a su vez se traduce en una reducción significativa del crecimiento.

Estudios posteriores, se han enfocado en desarrollar mediante el uso de estrategias nutricionales alimentos funcionales, con el propósito de evitar o reducir, problemas de salud intestinal relacionados con la ingesta de HS y, en consecuencia, promover el crecimiento del róbalo blanco. El quitosano es un polímero derivado de la desacetilación parcial de la quitina, que se encuentra principalmente en exoesqueletos de crustáceos, moluscos e insectos, su estructura está conformada por monómeros de α -D-Glucosamina y D-Acetil-glucosamina, esta estructura posee características fisicoquímicas tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y bioactividad de naturaleza policatiónica y mucoadhesivas (Goycoolea, 2009). Estas características funcionales otorgan al organismo la capacidad de facilitar la absorción de nutrientes a través de las barreras epiteliales intestinales, por acción de las interacciones mucoadhesivas (Bravo-Osuna *et al.*, 2007), por lo que puede mejorar la salud intestinal de los peces. Por lo tanto, el quitosano tiene potencial para usarse como aditivo funcional en la dieta para róbalo blanco.

Mesina-Peña *et al.* (2022) evaluaron el efecto de diferentes inclusiones dietéticas de quitosano (obtenido del exoesqueleto del camarón) sobre el crecimiento y la supervivencia de juveniles de róbalo blanco. Se elaboraron tres dietas experimentales con diferentes niveles de inclusión de quitosano (0, 0.5 y 1%) a partir de una dieta base para róbalo blanco, formulada con sustitución del 45% de proteína de HP con proteína de HS como lo describe Arriaga *et al.*, (2021). La inclusión

dietética de quitosano (0.5% y 1%), incrementa el crecimiento y mejora la eficiencia alimenticia de róbalo blanco en comparación con los peces alimentados con la dieta control sin quitosano. Estos resultados podrían atribuirse a la mucoadhesividad del quitosano en las mucinas intestinales (Bravo-Osuna *et al.*, 2007), debido a que estudios previos han reportado que la inclusión dietética de quitosano (0.5% y 4 %), incrementa la longitud de las vellosidades (borde de cepillo) y las microvellosidades intestinales, y disminuye la enteritis intestinal de algunas especies dulceacuícolas (Chen *et al.*, 2014; Zaki *et al.*, 2015), lo cual fue relacionado con el incremento en el crecimiento de estas especies. Los resultados preliminares de este estudio demuestran que el quitosano promueve el crecimiento del róbalo blanco alimentado con una dieta alta en HS. Sin embargo, más estudios sobre el efecto de la inclusión dietética de harina de soya y quitosano en la microanatomía intestinal de róbalo blanco, son necesarios para dilucidar el mecanismo por el cual el quitosano potencia el crecimiento de esta especie.

Actualmente, se encuentran en proceso estudios que determinarán el efecto del quitosano y la harina de soya sobre la microbiota y microanatomía intestinal de róbalo blanco, para dilucidar los posibles mecanismos de acción por los que el quitosano promueve el crecimiento de *C. viridis*. Así mismo, se encuentran en proceso estudios de fermentación de ingredientes vegetales con cepas de bacterias autóctonas de la industria lechera.

Referencias bibliográficas

- Arriaga-Hernández, D., Hernández, C., Martínez-Montaño, E., Ibarra-Castro, L., Lizárraga-Velázquez, E., Leyva-López, N., Chávez-Sánchez, M. C. 2021. Fish meal replacement by soybean products in aquaculture feeds for white snook, *Centropomus viridis*: Effect on growth, diet digestibility, and digestive capacity. *Aquaculture* 530, 735823.
- Bravo-Osuna, C. Vauthier, A. Farabollini, G. F. Palmieri., G. Ponchel. 2007. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Biomaterials* 28(13): 2233-43.
- Chen, X. Zhu, Y. Yang, D. Han, J. Jin., S. Xie. 2014. Effects of dietary chitosan on growth performance, haematology, immune response, intestine morphology, intestine microbiota and disease resistance in gibel carp (*carassius auratus gibelio*), *Aquac. Nutr.* 20: 532–546.
- Concha-Frías, B., González, C.A.A., Gaxiola, G., Chiappa, X., Sánchez-Zamora, A., Martínez-García, R., De la Cruz-Alvarado, F.J., 2018. Dietary protein requirement in common Snook (*Centropomus undecimalis*) juveniles reared in marine and brackish water. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 13, 45–54.
- Fischer, W, Krupp F, Schneider, W. Sommer C., Carpenter KE., Niem, VH., 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Vol. 2. Rome (Italy): FAO. Roma. 1,200 p.
- Herman, E.M., Schmidt, M.A., 2016. The potential for engineering enhanced functional feed soybeans for sustainable aquaculture feed. *Front. Plant Sci.* 7, 440.
- Ibarra-Castro, L., Navarro-Flores, J., Sanchez-Tellez, J.L., Martinez-Brown, J.M., Ochoa- Bojorquez, L.A., Rojo-Cebreros, A.H., 2017. Hatchery production of pacific White snook at CIAD-Unity Mazatlan. Mexico. *World Aquac.* 25.
- Krishnan, H.B., Jez, J.M., 2018. The promise and limits for enhancing sulfur-containing amino acid content of soybean seed. *Plant Sci.* 272, 14–21.
- Krogdahl, Å., Kortner, T.M., Jaramillo-Torres, A., Gamil, A.A.A., Chikwati, E., Li, Y., Storebakken, T., 2020. Removal of three proteinaceous antinutrients from soybean does not mitigate soybean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L). *Aquaculture* 514, 734495.
- Labastida-Che, A., Núñez-Orozco, A.L., Oviedo-Piamonte, J.A., 2013. Aspectos biológicos del robalo hocicudo *Centropomus viridis*, en el sistema lagunar Chantuto-Panzacola, Chiapas, Mexico. *Cienc. Pesq.* 21, 21–28.
- Lemus, I., Maldonado, C., Cuzon, G., Sanchez, A., Gaxiola, G., Alvarez, A., Guerrero, M., 2018. *In vitro* and *in vivo* feedstuff digestibility for Snook, *Centropomus undecimalis*. Juveniles. *J. World Aquac. Soc.* 49, 205–215.
- Macal-López, K.C., Velázquez-Velázquez, E., Rivera-Velazquez, G., 2013. Diversidad y traslape del nicho trófico de los robalos (*Perciformes: Centropomidae*) en la Reserva de la Biosfera La Encrucijada, Chiapas, México. *Lacandonia* 7, 91–98.
- Zaki M. A., El-S M., Salem, Gaber M. M., Nour, A. M. 2015. Effect of Chitosan Supplemented Diet on Survival, Growth, Feed Utilization, Body Composition & Histology of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *WJET* 38-47.

Interacción Bacteria Microalga en el Cultivo de Semilla del Ostión *Kumamoto Crassostrea sikamea*

Ángel I. Campa-Córdova^{1*}, Ana C. Sánchez-Ortiz², Gabriel Aguirre-Guzmán³, José M. Mazón-Suástegui¹, Ma del C. Flores-Miranda², Antonio Luna-González⁴, Norma Ochoa-Álvarez¹

¹ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). La Paz, B.C.S., 23096, México.

² Universidad de Guadalajara (U de G), CUCEI, Guadalajara, Jalisco, 48980, México.

³ Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Km 5 Carretera Victoria-Mante, Ciudad Victoria, Tamaulipas, Mexico.

⁴ Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-Sinaloa)-Instituto Politécnico Nacional (IPN), Departamento de acuicultura. Guasave, Sinaloa, 81049, México.

*Corresponding author: E-mail: angcamp04@cibnor.mx

Tel: +52-612-123-8484; Fax: +52-612-125-3625

https://www.mdpi.com/journal/antioxidants/special_issues/antioxidants_aquaculture

Resumen

En este estudio se evaluó *in vitro* la interacción entre bacterias probióticas del género *Bacillus* y dos especies de microalgas y su efecto posterior *in vivo* en el cultivo del ostión Kumamoto *Crassostrea sikamea*. Las cepas probióticas de *Bacillus licheniformis* (MAT32), *B. subtilis* (MAT43) y *B. subtilis subtilis* (GAtB1) se inocularon individualmente por triplicado en matraces de 250 mL conteniendo 1×10^4 unidades formadoras de colonias (UFC) mL⁻¹ de bacterias y 4.5×10^4 cél mL⁻¹ de microalgas (*Isochrysis galbana* o *Chaetoceros calcitrans*) para evaluar su crecimiento durante un cultivo de 7 días. Adicionalmente, se trataron por triplicado semillas de *C. sikamea* con cuatro cepas de bacilos individuales o combinadas en un cultivo de 28 días a una concentración de 1×10^6 UFC mL⁻¹ de la manera siguiente: (a) Control, sin tratamientos; (b) Combinación de dos antibióticos (10 mg L⁻¹); (c) *B. licheniformis*; (d) *B. subtilis*; (e) *B. subtilis subtilis*; (f) mezcla de bacilos. Los resultados mostraron incremento significativo ($P < 0.05$) en el crecimiento de cepas de *Bacillus* en co-cultivo con microalgas mientras que el crecimiento de *I. galbana* co-cultivado con bacterias no se redujo significativamente ($P > 0.05$) con el grupo control. La semilla de *C. sikamea* tratada con *Bacillus* mostró crecimiento y supervivencia significativo comparado con el grupo control. En este estudio, la microalga *C. calcitrans* fue susceptible a la presencia de bacterias probióticas. Sin embargo, la reducción del

crecimiento microalgal observada *in vitro* no afectó el incremento en crecimiento y supervivencia en el cultivo de semilla de *C. sikamea* expuesta a bacterias probióticas comparada con aquellas semillas cultivadas sin probióticos.

Palabras clave: *Crassostrea sikamea*, *Bacillus* spp., microalgas, moluscos, antibióticos

Bacteria and Microalgae Interaction on Rearing Kumamoto Oyster *Crassostrea sikamea* spat

Ángel I. Campa-Córdova^{1*}, Ana C. Sánchez-Ortiz², Gabriel Aguirre-Guzmán³, José M. Mazón-Suástegui¹, Ma del C. Flores-Miranda², Antonio Luna-González⁴, Norma Ochoa-Álvarez¹

¹ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). La Paz, B.C.S., 23096, México.

² Universidad de Guadalajara (U de G), CUCEI, Guadalajara, Jalisco, 48980, México.

³ Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Km 5 Carretera Victoria-Mante, Ciudad Victoria, Tamaulipas, Mexico.

⁴ Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-Sinaloa)-Instituto Politécnico Nacional (IPN), Departamento de acuicultura. Guasave, Sinaloa, 81049, México.

*Corresponding author: E-mail: angcamp04@cibnor.mx

Tel: +52-612-123-8484; Fax: +52-612-125-3625

https://www.mdpi.com/journal/antioxidants/special_issues/antioxidants_aquaculture

Abstract

This study assessed *in vitro* interaction between *Bacillus* bacteria and microalgae and their posterior *in vivo* effect on rearing Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea*. The probiotic strains *Bacillus licheniformis* (MAt32), *B. subtilis* (MAt43), and *B. subtilis subtilis* (GAtB1) were individually inoculated in triplicate into 250 mL flasks containing 1×10^4 colony forming units (CFU) mL^{-1} of bacteria and 4.5×10^4 cell mL^{-1} of microalgae (*Isochrysis galbana* or *Chaetoceros calcitrans*) to evaluate their growth during a 7-day culture. Single cultures of microalgae or bacilli served as control. Additionally, *C. sikamea* spat was treated for 28 days with four single/combined bacillus treatments in triplicate at a concentration of 1×10^6 CFU mL^{-1} as follows: (a) Control, without treatments; (b) Combination of two antibiotics (10 mg L^{-1}); (c) *B. licheniformis*; (d) *B. subtilis*; (e) *B. subtilis subtilis*; (f) mixed bacilli. The results showed a significantly ($P < 0.05$) increased growth of *Bacillus* strains co-cultured with microalgae while the growth of *I. galbana* co-cultured with bacteria was not reduced significantly ($P > 0.05$) compared with the control group. *C. sikamea* spat treated with *Bacillus* showed significantly ($P < 0.05$) higher growth and survival than the control group. In this study, *C. calcitrans* microalgae were susceptible to the presence of probiotic bacteria. Nonetheless, this reduction in microalgal growth observed *in vitro* increased growth and survival of *C. sikamea* spat exposed to probiotic bacteria compared to spat without probiotics.

Key words: *Crassostrea sikamea*, *Bacillus* spp., microalgae, mollusks, antibiotics

Introduction

The Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* is appreciated as food by local inhabitants along the Gulf of California [1]; despite its preference, few studies have been performed with this species describing distribution and abundance [1, 2], hatchery seed production [3], reproductive biology [4], diseases and parasitism [5, 6] and composition and diversity of the gut [7].

Infectious diseases are the main cause of major economic losses in the oyster industry, particularly during seed production in hatchery [4]. Most of the mortality peaks have been attributed to pathogenic bacteria (*Vibrio* spp.) that has caused high economic losses [8]. Antibiotics are commonly used to avoid the adverse effects of pathogens in aquaculture [9, 10]. However, misuse and overuse of antibiotics in bivalve aquaculture for controlling these mortalities contributes to the development of more virulent pathogenic strains, associated with a reduced microalgal density, poor organism growth, and mass mortalities that raise production costs [11, 12]. Antibiotics can remain active for long periods in water and sediments, which is harmful to the environment, contributing to the selective development of resistant bacteria, some highly pathogenic for farming organisms and even humans [13]. One alternative of natural origin, and therefore, low environmental impact, is using beneficial microorganisms to reduce the use and overuse of antibiotics [14]. Several studies have shown the benefits of bacterium administration because of its positive impact on various metabolic and immunomodulatory processes, which translates into higher host growth and survival [15, 16].

The purpose of adding microorganisms in diets of farming organisms is to generate a beneficial relationship between the microorganism and the host and between the microorganism and microflora in the digestive organs; thus, these relationships seek the following characteristics: (1) pathogen antagonism by competitive exclusion or antimicrobial production and stimulation of host immune response; (2) metabolite production; (3) nutritional substance production; (4) survival and colonisation in the host digestive tract (DT) by adhesion; (5) storage stability; (6) safety; (7) origin from animal source [12, 16]. The use of beneficial organisms or probiotics offers wide opportunities for shellfish aquaculture [17, 18] because of their antimicrobial properties [19], particularly against different species of pathogenic *Vibrio* spp. [20]. However, few studies of the interaction between bacteria and the microalgae used as food for molluscs are available [21]. Some microalgal species are more susceptible than others to the presence of bacteria [22].

Therefore, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* growth of beneficial bacteria co-cultured with microalgae and the effect of the bacterium on rearing of Kumamoto oyster *C. sikamea* spat. The probiotic strains reported in this study were previously isolated from *Anadara tuberculosa* and evaluated *in vitro* [23] and *in vivo* in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* [23, 24].

Materials and Methods

Bacterial cultivation

Bacillus strains GAtB1 (*B. subtilis* sub. *subtilis*), MAt32 (*B. licheniformis*) and MAt43 (*B. subtilis*) were isolated from the digestive tract (DT) of *A. tuberculosa* [23]. Each strain was grown in Tryptic Soy Broth (TSB, #257107, Bioxon BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) with 2.5% NaCl and incubated at 35 °C for 24 h. Cultures were washed twice, centrifuged at $3000 \times g$ at room temperature for 10 min (Beckman model GS-15R, Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, U.S.A.) and re-suspended in sterile seawater. Bacterial suspension was adjusted to an optical density of 1.0 at 600 nm (Beckman DU 600, Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, U.S.A.). The cell density was adjusted to 1×10^6 CFU mL⁻¹, which was confirmed by counting CFU of serial dilutions on agar plate (Tryptic Soy Agar; TSA, # 211670, Bioxon BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA).

Microalgal cultivation

Isochrysis galbana (v. *aff galbana*, code UTEX LB 2307; origin: Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste (CIBNOR collection) and *Chaetoceros calcitrans* (origin: L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER collection) were cultivated in sterilised glass flasks with a final volume of 700 mL of sterile seawater (35 psu) enriched with 750 µL of Guillard F/2 medium, pH 8 [25]. The strains were incubated at 28 ± 1 °C with continuous flow of filtered air and daylight-type lighting from fluorescent lamps 5940-5370 lux 50 cm away, photoperiod 16: 8 h. Cell density was determined by triplicate, samples were taken from each flask, diluted 1:10, and counted in a Neubauer Cell Chamber under an optical microscope (Olympus BH-2). Cell density was reported as cell·mL⁻¹.

Bacterium-microalga interaction

The *in vitro* interaction between two microalgae and three probiotic bacteria were evaluated as follows: (1) Is: *I. galbana*; (2) Ch: *C. calcitrans*; (3) Bl: *B. licheniformis*; (4) Bs: *B. subtilis*; (5) Bss: *B. subtilis* sub. *subtilis*; (6) Mix 1: Is+ Bl; (7) Mix 2: Ch+Bl; (8) Mix 3: Is+Bss; (9) Mix 4: Ch+Bss; (10) Mix 5: Is+Bss; (11) Mix 6: Ch+Bss. The growth of a single and mixed cultures was evaluated by triplicate inoculating flasks with 4.5×10^4 cell·mL⁻¹ of microalgae and/or 1.0×10^4 CFU·mL⁻¹ of bacteria and incubated at the conditions described for microalgal culture. Samples for microalgae and bacteria count were taken at days 3, 5, and 7.

Culture conditions of juvenile oysters

Kumamoto spat, *C. sikamea* (5 ± 0.5 mm mean shell length) were donated by commercial hatchery Acuacultura Robles, in La Paz, Baja California Sur, Mexico. Oysters were previously acclimated in 80-L fiberglass tanks filled with 60-L of filtered (2µm) and Ultraviolet-sterilised seawater at $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ and 36 ± 1 g·L⁻¹ of salinity for one week. For the experimental bioassay, the seeds were counted, measured, weighed, and placed in 4-L plastic containers (N = 60) filled with 2-L of filtered (2 µm) and UV sterilised seawater ($25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, 36 ± 1 ups) with continuous aeration. Juveniles were fed with mixed *I. galbana* and *C. calcitrans* (1:1 proportion) microalgae, at a density of 1.7×10^3 cell·mL⁻¹·day⁻¹, divided into four portions. Containers were drained, washed, and refilled with clean, and UV-sterilised seawater every 48 h.

Exposure of juveniles to bacteria

Triplicate groups of 60 spat oysters were exposed to four bacterial treatments at a final concentration of 1×10^6 CFU mL⁻¹ and combination of two commercial antibiotics [26] used as positive control at a concentration of 10 mg·L⁻¹ [9,27,28]. The treatments were added after every seawater change for 28 days: **T1** = Antibiotic (ampicillin + streptomycin; 1:1 proportion); **T2** = *B. licheniformis*; **T3** = *B. subtilis*; **T4** = *B. subtilis* subsp. *subtilis*; **T5** = *B. licheniformis*+ *B. subtilis*+ *B. subtilis* subsp. *subtilis*; 1: 1: 1 proportion. **C** = Control group, no bacteria or antibiotics added. Samples were randomly collected at days 7, 14, 21 and 28 to evaluate growth rate.

Growth rate

Growth was evaluated placing 30 samples per container on graph paper laminate, taking a photographic image to measure length and width using the Image-Pro Plus version 5.1 software (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). At day 28, average final length was achieved in each treatment, as well as absolute growth (AG) according to Ziaei-Nejad *et al.* [29]:

$$AG = L_f - L_i$$

where L_f = final average length, and L_i = initial average length.

The coefficient of variation (CV) regarding length was calculated as:

$$CV = S / X * 100$$

where S = standard or variance deviation and X = average sample.

Statistical analysis

Group normality was analysed with the Kolmogorov-Smirnov test, and then with Bartlett test, for homogeneity of variance. Thereafter, one-way ANOVA was used to assess for significant differences in growth. When the data showed significant differences Tukey's *post hoc* honestly significant difference (HSD) analysis was used. Level of significance was set at $P \leq 0.05$ for all analyses. All statistical analyses were performed using Statistica 7.0 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

Results

Growth of microalgae and bacteria

The interaction of *I. galbana* and *C. calcitrans* cultivated with *B. licheniformis* for seven days is shown in Figure 1. After co-culture with *B. licheniformis*, *C. calcitrans* showed a significant decrease ($P < 0.05$) in growth more than the control (*C. calcitrans* without bacterial strains) at days 5 and 7 (Fig. 1A). However, the cell density of *C. calcitrans* co-cultured with *B. licheniformis* increased from 4.5×10^4 cell·mL⁻¹ to 3.5×10^6 cell·mL⁻¹ at day 7. The growth of *I. galbana* was not influenced by *B. licheniformis*. Figure 1B shows the growth of *B. licheniformis* cultured with *I. galbana* and *C. calcitrans*. The density of *B. licheniformis* significantly increased ($P < 0.05$) with *I. galbana* and *C. calcitrans* cultures compared to the growth of *B. licheniformis* without microalgae (control) at days 5 and 7. The highest growth of *B. licheniformis* was reached with *C. calcitrans* at day 5 (Figure 1B).

Figure 2 shows growth of microalgae in co-culture with *B. subtilis* for seven days. The growth of *I. galbana* was not affected by *B. subtilis*, and cell density of *C. calcitrans* decreased significantly when compared to control at days 5 and 7 (Figure 2A). When *B. subtilis* was cultured with microalgae, growth significantly increased ($P < 0.05$) since day 3 (Figure 2B).

The growth of *I. galbana* was not negatively influenced by *B. subtilis subtilis* at seven days of culture (Figure 3A). However, when *C. calcitrans* was co-cultured with the bacteria, cell density decreased significantly ($P < 0.05$) more than control at days 5 and 7. Figure 3B shows a significant ($P < 0.05$) growth increase in *B. subtilis subtilis* when it had been exposed to both microalgal strains since day 3. The highest growth of *B. subtilis subtilis* was recorded in co-culture with *C. calcitrans*.

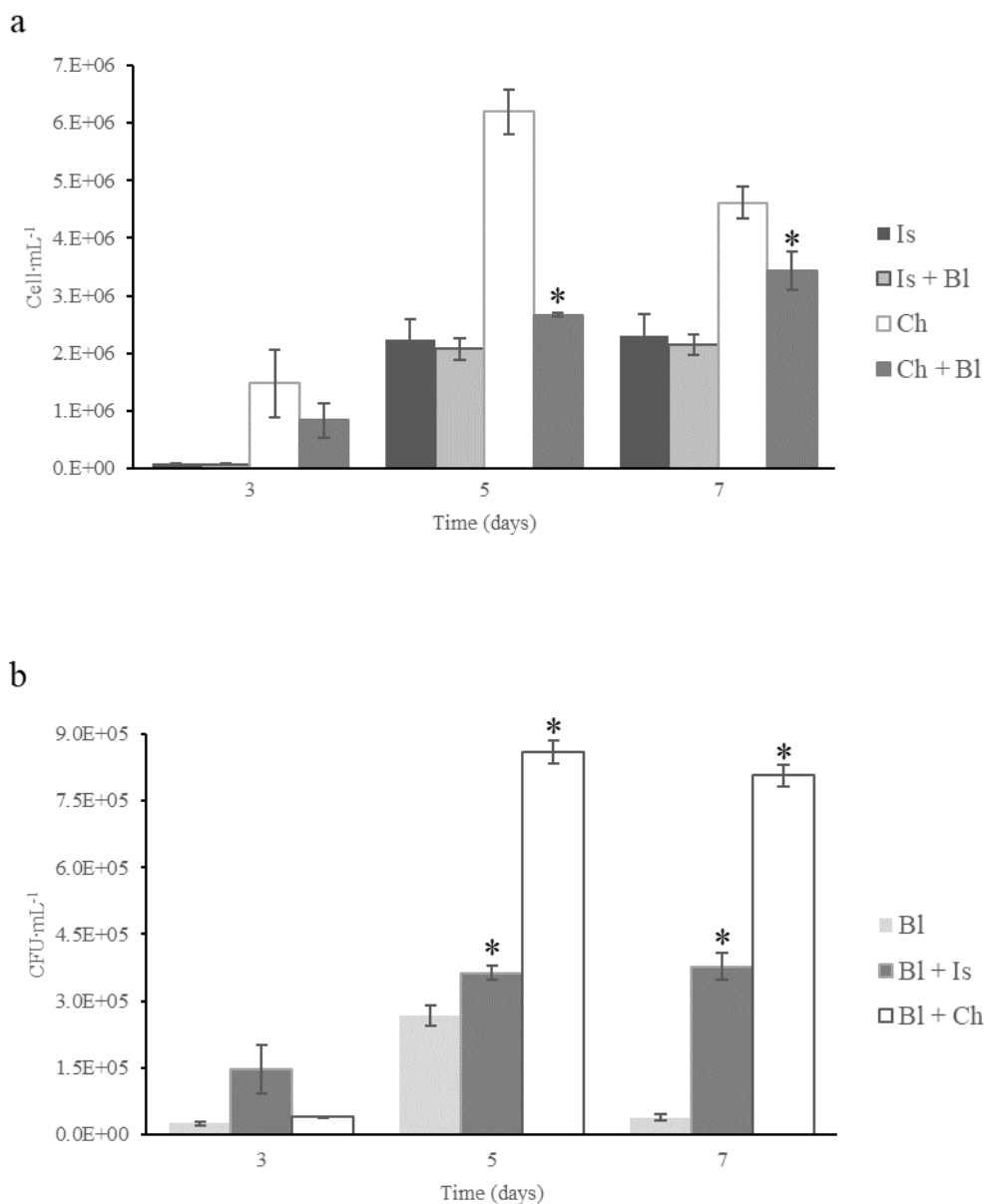


Figure 1 (a) Microalgal growth in co-culture with bacteria. **Is** = *Isochrysis galbana* (control); **Is + Bl** = *I. galbana* + *Bacillus licheniformis*; **Ch** = *Chaetoceros calcitrans* (control); **Ch + Bl** = *C. calcitrans* + *B. licheniformis*. (b) Bacterial growth in co-culture with microalgae. **Bl** = *B. licheniformis* (control); **Bl + Is** = *B. licheniformis* + *I. galbana*; **Bl + Ch** = *B. licheniformis* + *C. calcitrans*. Bars correspond to standard error (SE). (*) significantly ($P < 0.05$) different than control.

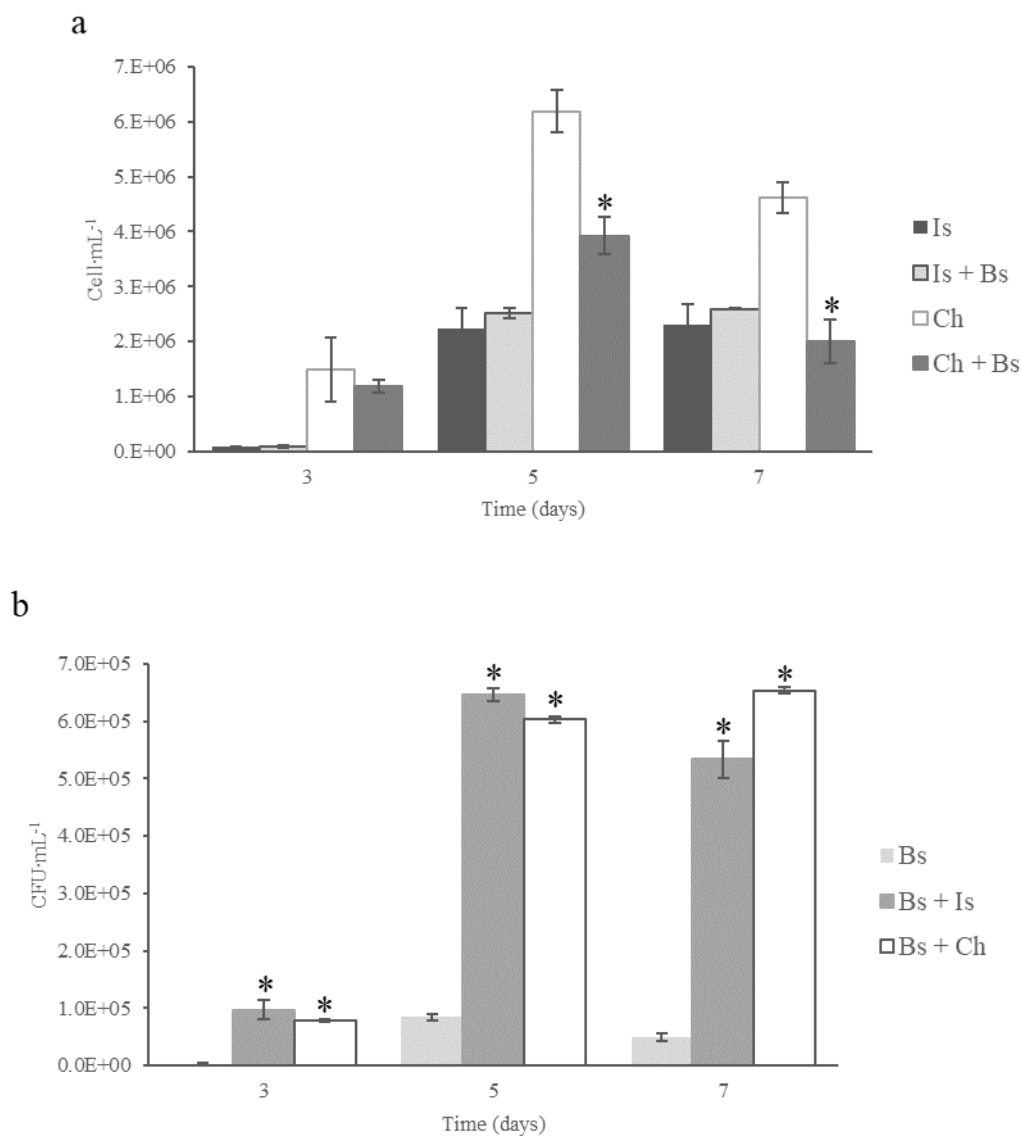


Figure 2 (a) Microalgal growth in co-culture with bacteria. **Is** = *Isochrysis galbana* (control); **Is + Bs** = *I. galbana* + *Bacillus subtilis*; **Ch** = *Chaetoceros calcitrans* (control); **Ch + Bs** = *C. calcitrans* + *B. subtilis*. (b) Bacterial growth in co-culture with microalgae. **Bs** = *B. subtilis* (control); **Bs + Is** = *B. subtilis* + *I. galbana*; **Bs + Ch** = *B. subtilis* + *Ch. Calcitrans*. Bars correspond to standard error (SE). (*) significantly ($P < 0.05$) different than control.

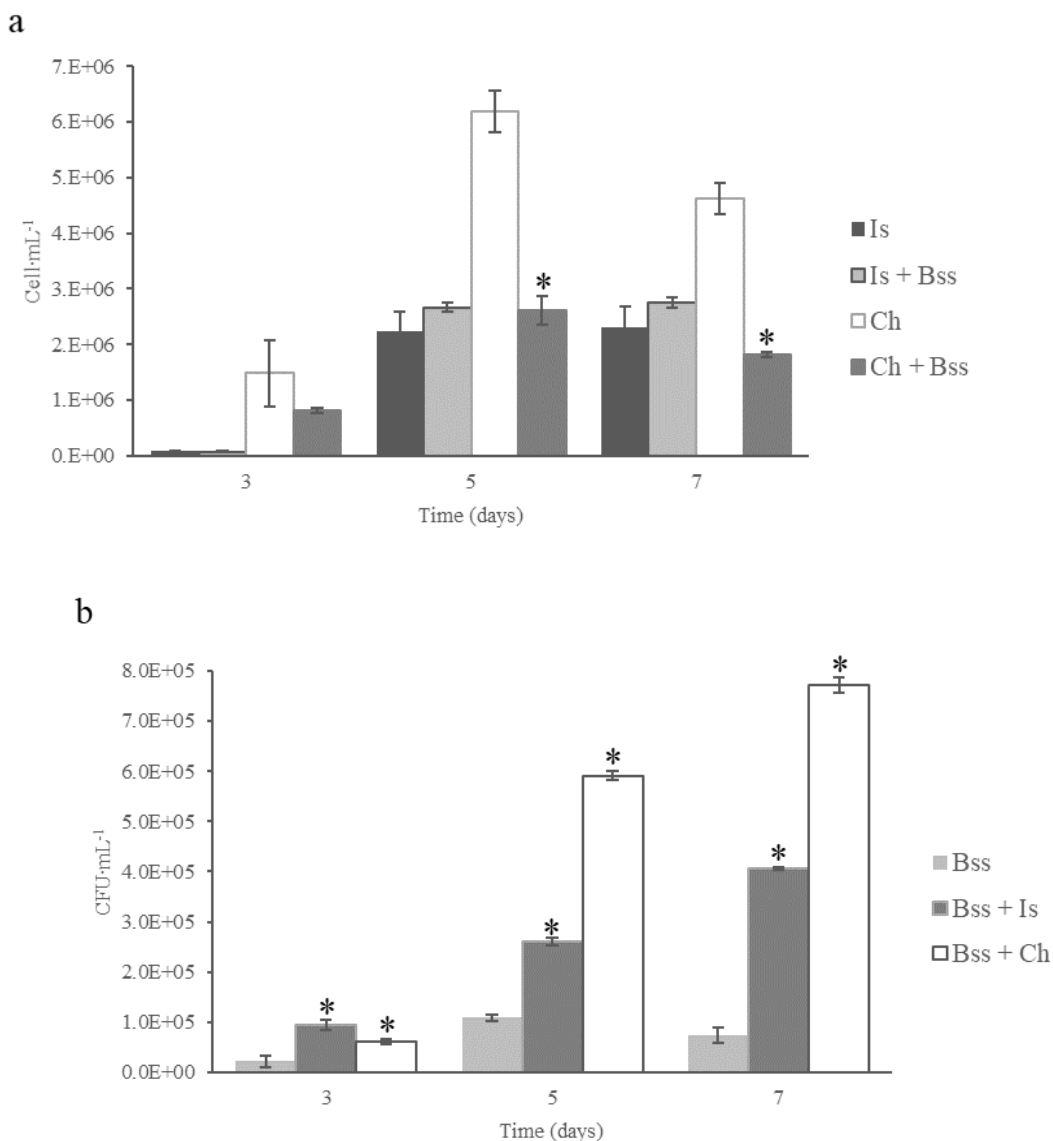


Figure 3 **(a)** Microalgal growth in co-culture with bacteria. **Is** = *Isochrysis galbana* (control); **Is + Bss** = *I. galbana* + *Bacillus subtilis subtilis*; **Ch** = *Chaetoceros calcitrans* (control); **Ch + Bss** = *C. calcitrans* + *B. subtilis subtilis*. **(b)** Bacterial growth in co-culture with microalgae. **Bss** = *B. subtilis subtilis* (control); **Bss + Is** = *B. subtilis subtilis* + *I. galbana*; **Bss + Ch** = *B. subtilis subtilis* + *C. calcitrans*. Bars correspond to standard error (SE). (*) significantly ($P < 0.05$) different than control.

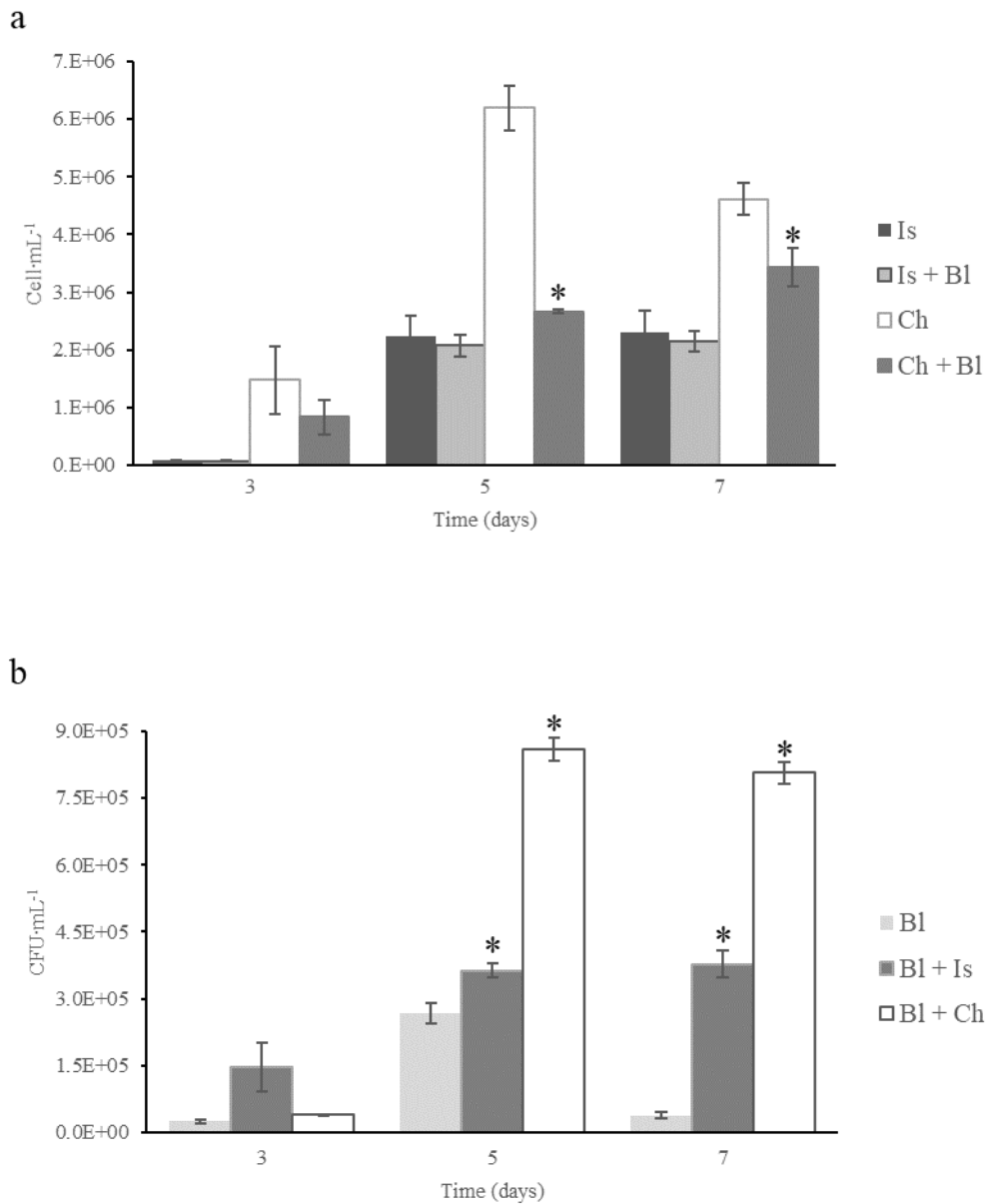


Figure 4 (a) Microalgal growth in co-culture with bacteria. **Is** = *Isochrysis galbana* (control); **Is + Bl** = *I. galbana* + *Bacillus licheniformis*; **Ch** = *Chaetoceros calcitrans* (control); **Ch + Bl** = *C. calcitrans* + *B. licheniformis*. (b) Bacterial growth in co-culture with microalgae. **Bl** = *B. licheniformis* (control); **Bl + Is** = *B. licheniformis* + *I. galbana*; **Bl + Ch** = *B. licheniformis* + *C. calcitrans*. Bars correspond to standard error (SE). (*) significantly ($P < 0.05$) different than control.

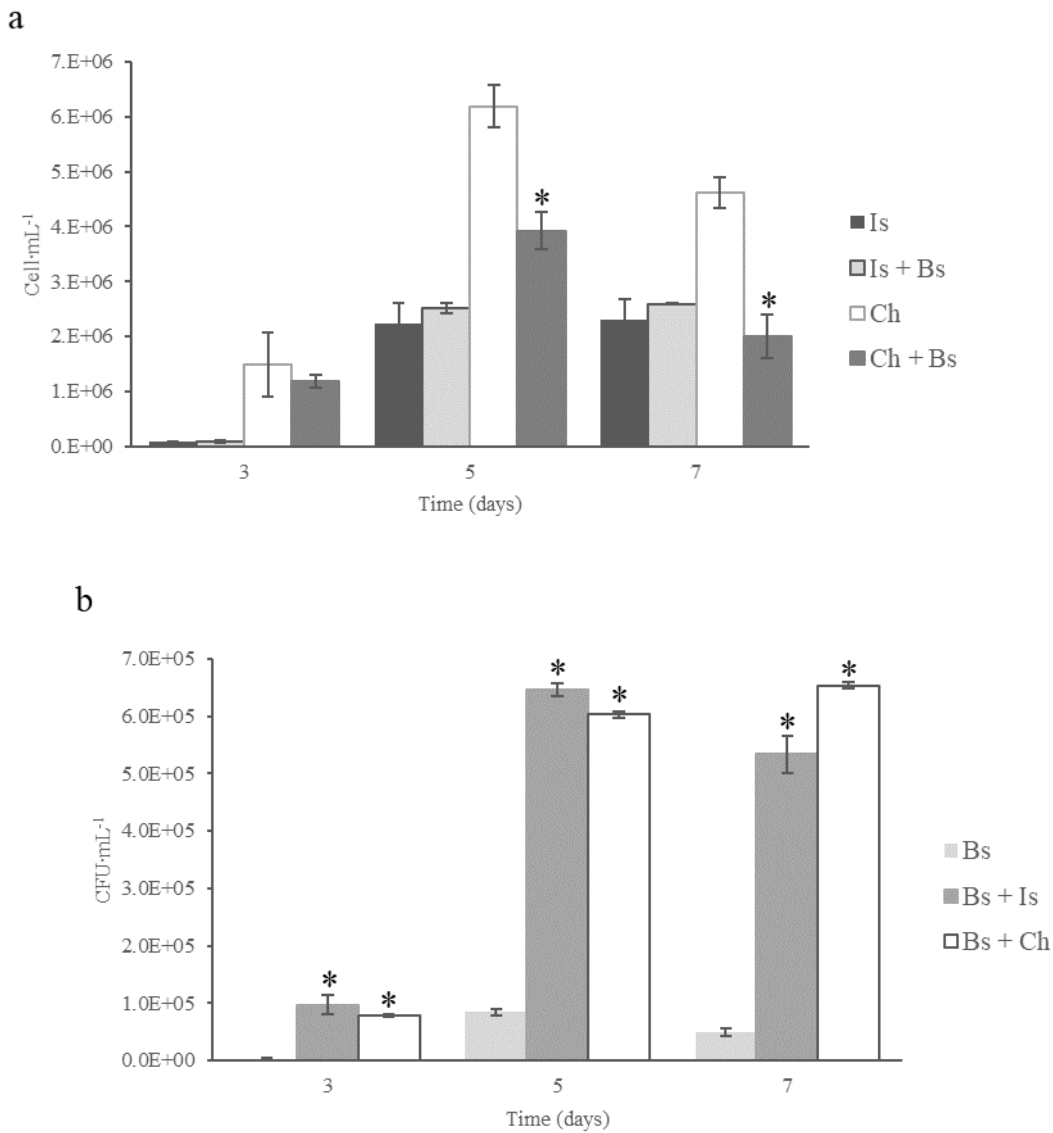


Figure 5 (a) Microalgal growth in co-culture with bacteria. **Is** = *Isochrysis galbana* (control); **Is + Bs** = *I. galbana* + *Bacillus subtilis*; **Ch** = *Chaetoceros calcitrans* (control); **Ch + Bs** = *C. calcitrans* + *B. subtilis*. (b) Bacterial growth in co-culture with microalgae. **Bs** = *B. subtilis* (control); **Bs + Is** = *B. subtilis* + *I. galbana*; **Bs + Ch** = *B. subtilis* + *Ch. Calcitrans*. Bars correspond to standard error (SE). (*) significantly ($P < 0.05$) different than control.

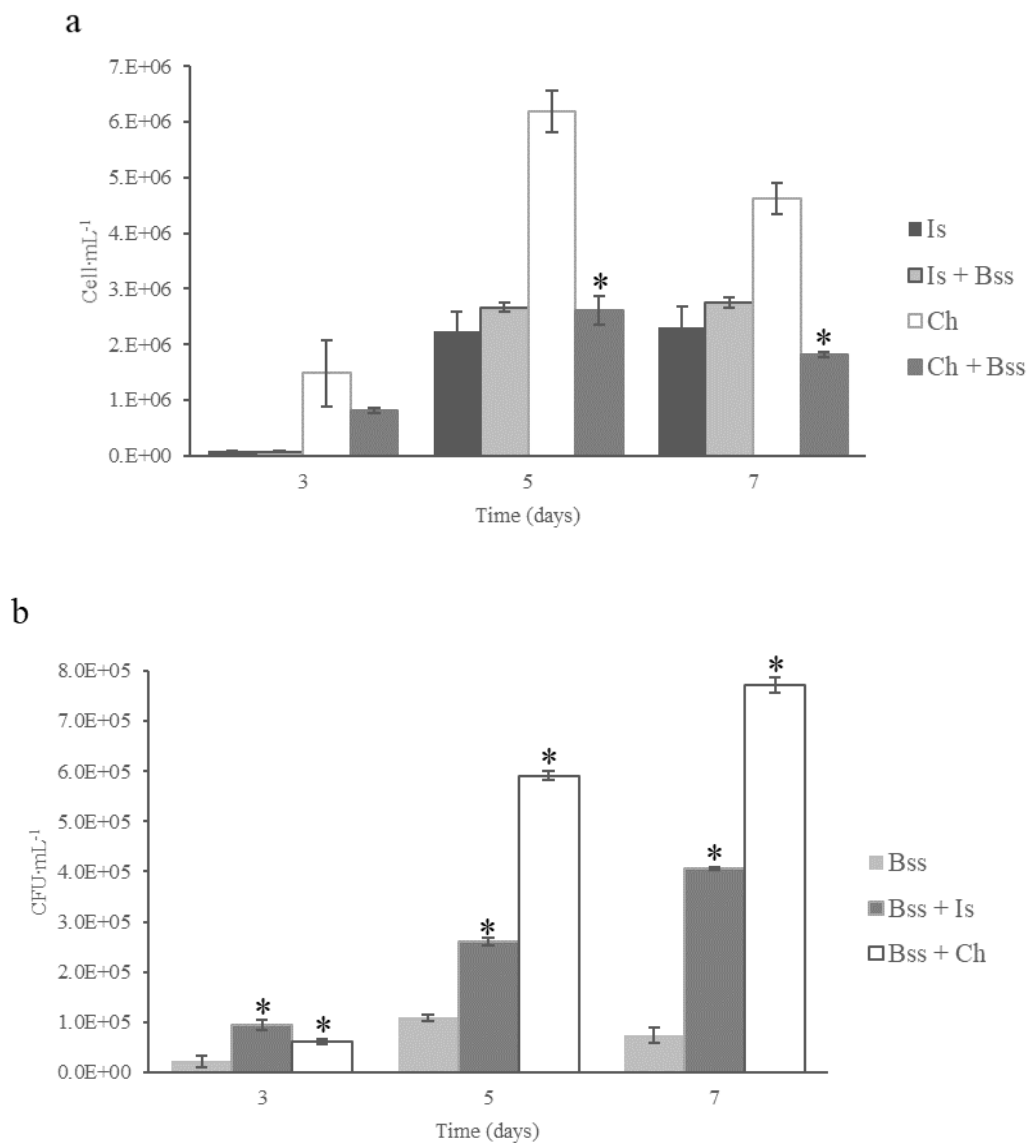


Figure 6 **(a)** Microalgal growth in co-culture with bacteria. **Is** = *Isochrysis galbana* (control); **Is + Bss** = *I. galbana* + *Bacillus subtilis subtilis*; **Ch** = *Chaetoceros calcitrans* (control); **Ch + Bss** = *C. calcitrans* + *B. subtilis subtilis*. **(b)** Bacterial growth in co-culture with microalgae. **Bss** = *B. subtilis subtilis* (control); **Bss + Is** = *B. subtilis subtilis* + *I. galbana*; **Bss + Ch** = *B. subtilis subtilis* + *C. calcitrans*. Bars correspond to standard error (SE). (*) significantly ($P < 0.05$) different than control.

Growth of *Crassostrea sikamea*

The growth and survival of *C. sikamea* spat treated with beneficial bacteria for 28 days is shown in Table I. Juvenile oysters treated with *B. subtilis* (T3) significantly ($P < 0.05$) increased in length more than the control group. However, absolute growth ($F_{0.05(5,320)} = 2.559$, $p = 0.0273$) and survival ($F_{0.05(5,12)} = 13.962$, $p = 0.00012$) of oysters treated with bacteria were significantly higher than those in the control and antibiotic groups. The highest absolute growth was recorded in *C. sikamea* treated with *B. subtilis* and highest survival in spat treated with bacterial mix (T5).

Table I Growth of juvenile *Crassostrea sikamea* reared for 28 days with: (Control) untreated oysters; (T1) Antibiotic; (T2) *Bacillus licheniformis*; (T3) *Bacillus subtilis*; (T4) *Bacillus subtilis subtilis*; (T5) Mixed bacilli. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

Treatment	Length (mm)	Absolute Growth	Survival (%)
C	6.38 ^{ab} ±0.16	1.38 ^a	33 ^a ±1.15
T1	6.26 ^a ±0.13	1.26 ^a	32 ^a ±1.89
T2	6.74 ^{ab} ±0.11	1.74 ^b	76 ^b ±0.89
T3	6.83 ^b ±0.12	1.82 ^b	63 ^b ±2.09
T4	6.74 ^{ab} ±0.09	1.73 ^b	77 ^b ±1.01
T5	6.66 ^{ab} ±0.09	1.65 ^b	81 ^b ±0.21

Discussion

Feeding bivalve mollusks with live microalgae plays an essential role in larval and juvenile development, providing important nutrients for growth [30]. However, to improve these safe features, the use of antibiotics is a regular practice [31], which may destroy microalgal cells, avoid adequate feeding of farmed organisms and decline the quality of microalgae [32]. In this sense, Campa-Córdova *et al.* [33] reported that higher doses than 6 mg.mL⁻¹ of chloramphenicol or erythromycin significantly affected growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis*. Thus, the use of beneficial bacteria may be an alternative prophylactic method to that of antibiotics for mollusk farming. However, the interaction between bacterial populations and microalgae may also affect the development of some microalgal species. In this study, the growth of *I. galbana* with

probiotic bacteria was not significantly affected, but co-culture of *C. calcitrans* with probiotic bacteria resulted in a significantly reduced microalgal growth when compared to the control (growth of *C. calcitrans* without bacteria) group. Nevertheless, the *in vitro* growth of both microalgal strains did not stop during the 7-day co-culture with the tested *Bacillus* sp. In this sense, Grossart *et al.* [34] reported higher growth of *Thalassiosira rotula* when exposed to marine bacteria; Grossart and Simmon [35] concluded that increased growth of microalgae depended on the bacterial species and nutrient and vitamin concentrations in the environment. Other studies have reported advantages of using co-culture of microalgae and beneficial bacteria. Toi *et al.* [36] reported an improved biomass production of *Artemia* sp. exposed to heterotrophic bacteria with a low microalgal feeding regime, concluding that bacterial role could be an additional nutrient source. De Paiva-Maia *et al.* [37] enhanced phytoplankton concentration in an intensive recirculation system of *Litopenaeus vannamei* farming treated with a commercial probiotic. Pacheco-Vega *et al.* [38] showed that the use of both, microalgae *Schizochitrium* sp. and *Lactobacillus plantarum* in rearing *L. vannamei* avoided the periodical probiotic supplementation and reduced the use of molasses (sugar cane) during farming. In this study, the growth of probiotic bacteria significantly improved in co-culture of *I. galbana* or *C. calcitrans* when compared to the control (growth of bacteria without microalgae). This result could be used to increase probiotic bacteria density in culture systems, and in consequence reduce potential pathogenic bacteria. Microalgal-bacterial interactions have been previously described as a mutualistic relationship in which both microorganisms benefit each other [21,22,39]. The positive effect observed on bacterial growth in co-culture with microalgae may represent a proposal for biocontrol because the increased bacterial growth with probiotic potential and the antibacterial effect have been evident in some microalgae against pathogens for aquaculture [40].

In aquaculture, the genus *Bacillus* spp. have been successfully used to improve water quality, reduce the load of harmful bacteria, and maximise the host immune response [41]. Moreover, using mixes of different *Bacillus* strains instead of monospecific ones offers advantages for enhancing the overall health of the host, likely in response to the specific synergy of the mix [42]. In this study, *C. sikamea* spat treated with *Bacillus* strains (individually or mixed), significantly improved absolute growth and survival, compared to the control and antibiotic groups. The studies with the use of *B. subtilis* and *B. licheniformis* as probiotic dietary supplements in aquaculture systems are rapidly increasing [43]. For example, a mixture of *B. subtilis* and *B. licheniformis* improves

resistance against *V. alginolyticus* activating the unspecific immune system of *Penaeus japonicus* shrimp [15]. The synergy effect has been shown in other studies in which only mixtures of *Bacillus* spp. (*B. endophyticus*, and *B. tequilensis*) improved growth of juvenile white shrimp *L. vannamei* [44] and the mixture of *B. subtilis*, *B. firmus*, and *B. flexus* also improved the growth and condition of white shrimp [45].

Separately, *B. subtilis* was reported as a probiotic in aquaculture [46], for example, to improve growth of Nile tilapia and immune modulation with respect to neutrophil adherence and lysozyme activity [47] or improve growth, digestive enzyme activity, resistance to *Vibrio harveyi* and upregulation of immune gene expression when fed in equal proportions to juvenile white shrimp for eight weeks at 10^8 cells g^{-1} of feed [48]. The species that have been most extensively examined on their responses to probiotics are *B. subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* and *B. licheniformis*. For more information, a review of the use and benefit of *Bacillus* sp. in aquaculture is available in Nemutanzhela *et al.* [41]. The increased growth in *C. sikamea* spat could be given through improved nutritional status and feed digestibility in the host associated to the addition of beneficial bacteria [49] and the additional proteins and lipids provided by *Bacillus* [17].

Organisms that improve their immune status by adding beneficial bacteria find themselves less stressed, so they reduce their energy consumption, having more energy available for growth; these organisms are also less susceptible, maintaining a higher metabolic homeostasis, so mortality decreases even before pathogen invasion [50]. In this study, the increased survival of juvenile *C. sikamea* treated with beneficial bacteria may be due to an induced better nutritional and immune status than untreated juveniles (control group) and those treated with the antibiotic.

Conclusion

The addition of selected *Bacillus* strains in culture of *Isochrysis galbana* did not affect growth significantly, and *C. calcitrans* resulted more sensitive to the presence of bacteria. Probiotic bacteria increased cell density in co-culture with microalgae and increased growth and survival of *C. sikamea* spat.

Acknowledgments

The authors thank CIBNOR staff: Delfino Barajas-Frías and Pablo Ormart-Castro for hatchery-rearing of larvae and juveniles; Julian Garzón-Favela for provision of microalgae; Maria Del Carmen Rodriguez Jaramillo for technical support with the fluorescence microscope and Diana Fisher for editorial services. Acuacultura Robles S.P.R. of R.I. donated oyster specimens. Funding was provided by CIBNOR, SEP-CONACYT (243532), and PROINNOVA-CONACYT (199788) grants. First author was recipient of a doctoral fellowship from CONACYT (209357).

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval: All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed by the authors.

References

1. Camara MD, Davis JP, Sekino M, Hedgecock D, Li G, Langdon CJ, Evans S (2008) The Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* is neither rare nor threatened by hybridization in the northern Ariake sea, Japan. *J Shellfish Res* 27:313-322
2. Wang H, Qian L, Wang A, Guo X (2013) Occurrence and Distribution of *Crassostrea sikamea* (Amemiya 1928) in China. *J Shellfish Res* 32:439-446. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2983/035.032.0224>
3. Sekino M (2009) In search of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* (Amemiya, 1928) based on molecular markers: is the natural resource at stake? *Fish Sci* 75:819-831. doi.org/10.1007/s12562-009-0100-6
4. Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R, Guerrero-Rentería Y (2012) Early gametogenesis of Kumamoto oyster (*Crassostrea sikamea*). *Hidrobiológica* 22(2):181-184.
5. Elston RA, Moore J, Abbott CL (2012) Denman Island disease (causative agent *Mikrocytos mackini*) in a new host, Kumamoto oysters *Crassostrea sikamea*. *Dis Aquat Organ* 102:65-71. <https://doi.org/10.3354/dao02519>
6. Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R (2013) Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción. *Cienc Pesq* 21:5-48.
7. Trabal-Fernández N, Mazón-Suástegui JM, Vázquez-Juárez R, Ascencio-valle F, Romero J (2014) Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. *FEMS Microbiol Ecol* 88:69-83. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12270>
8. Sainz J, Maeda-Martínez A, Ascencio F (1998) *Microb Ecol* 35:188. <https://doi.org/10.1007/s002489900073>
9. Campa-Córdova AI, Luna-González A, Zarain-Herzberg M, Cáceres-Martínez JC (2005) Prophylactic use of antibiotics in larval culture of *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1835). *J. Shellfish Res* 24(4):923-930. [http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[923:PUOAIL\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[923:PUOAIL]2.0.CO;2)
10. Li N, Lin Q, Fu X, Guo H, Liu L, Wu S (2015) Development and efficacy of a novel streptomycin-resistant *Flavobacterium johnsoniae* vaccine in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) *Aquaculture* 448:93-97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.047>
11. Holmström K, Gräslund S, Wahlström A, Pongshompoon S, Bengtsson BE, Kautsky N (2003). Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *Int J Food Sci Technol* 38:255-266. doi:10.1046/j.1365-2621.2003.00671.x
12. Nwachi OF (2013) An overview of the importance of probiotics in aquaculture. *J Fish Aquat Sci* 8:30-32.
13. Navarrete P, Caruffo M (2015) Antibiotics in aquaculture: impacts and alternatives. *APUA Newsl* 33(2):4-7.
14. Martínez-Córdova LR, Emerenciano M, Miranda-Baeza A, Martínez-Porchas M (2015) Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: An updated review. *Rev Aquac* 7:131-148. doi:10.1111/raq.12058
15. Zhang Q, Tan B, Mai K, Zhang W, Ma H, Ai Q, Wang X, Liufu Z (2011) Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). *Aquac Res* 42:943-952. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02677.x

16. Tuan TN, Duc PM, Hatai K (2013) Overview of the use of probiotics in aquaculture. *Int J Res Fish Aquac* 3(3):89-97.
17. Abasolo-Pacheco F, Saucedo PE, Mazón-Suástegui JM, Tovar-Ramírez D, Araya R, Ramírez-Orozco JM, Campa-Córdova ÁI (2016) Isolation and use of beneficial microbiota from the digestive tract of lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* and winged pearl oyster *Pteria sterna* in oyster aquaculture. *Aquac Res* 47:3042–3051. doi:10.1111/are.12754
18. Escamilla-Montes R, Luna-González A, Flores-Miranda MC, Álvarez-Ruiz P, Fierro-Coronado JA, Sanchez-Ortiz AC (2015) Isolation and characterization of potential probiotic bacteria suitable for mollusk larvae cultures. *Thai J Veterenary Med* 45(1):11-21.
19. Prado S, Romalde JL, Barja JL (2010). Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Vet Microbiol* 145:187-97. doi:10.1016/j.vetmic.2010.08.021
20. Gibson LF, Woodworth J, George AM (1998) Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster , *Crassostrea gigas* , when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture* 169:111-120.
21. Fuentes J, Garbayo I, Cuaresma M, Montero Z, González-del-Valle M, Vílchez C (2016) Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. *Mar Drugs* 14:100. <https://doi.org/10.3390/md14050100>
22. Avendaño RE, Riquelme CE (1999) Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquac Res* 30: 893-900.
23. Sánchez-Ortiz AC, Luna-González A, Campa-Córdova ÁI, Escamilla-Montes R, Flores-Miranda MC, Mazón-Suástegui JM (2015) Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. *Lat Am J Aquat Res* 43:123-136. doi:10.3856/vol43-issue1-fulltext-11
24. Sánchez-Ortiz AC, Angulo C, Luna-González A, Álvarez-Ruiz P, Mazón-Suástegui JM, Campa-Córdova AI (2016) Effect of mixed-*Bacillus* spp. isolated from pustulose ark *Anadara tuberculosa* on growth, survival, viral prevalence, and immune-related gene expression in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 59:95-102. [http://dx.doi.org/10.1016.j.fsi.2016.10.022](http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.022)
25. Guillard RRL (1973) Handbook of phycological methods. Cambridge ed Division rates London.
26. Benbrook CM (2002) Antibiotic Drug Use in US Aquaculture. Northwest Science and Environmental Policy Center Sandpoint, Idaho. <http://www.iatp.org/documents/antibiotic-drug-use-in-us-aquaculture-1>.
27. Campa-Córdova AI, González-Ocampo HA, Luna-González A, Mazón-Suástegui JM, Ascencio F (2009) Growth survival and superoxide dismutase activity in juvenile *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) treated with probiotics. *Hidrobiológica* 19(2):151-157.
28. Luis-Villaseñor IE, Campa-Córdova AI, Huerta-Aldaz N, Luna-González A, Mazón-Suástegui JM, Flores-Higuera F (2013) Effect of beneficial bacteria on larval culture of Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Afr J Microbiol Res* 7(27):3471-3478.
29. Ziaei-Nejad S, Rezaei MH, Takami GA, Lovet DL, Mirvaghefi AR, Shakouri M (2006) The effect of *Bacillus*

- spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 252(2-4):516-524. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.07.021.
30. Hemaiswarya S, Raja R, Kumar R, Ganesan V, Anbazhagan C (2011) Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol* 27:1737-1746. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0632-z>
 31. Nicolas JL, Corre S, Gauthier G, Robert R, Ansquer D (1996) Bacterial problems associated with scallop (*Pecten maximus*) larval culture. *Dis Aquat Org* 27:67-76.
 32. Aguilar-Macías OL, Ojeda-Ramírez JJ, Campa-Córdova AI, Saucedo PE (2010) Evaluation of natural and commercial probiotics for improving growth and survival of the pearl oyster, *Pinctada mazatlanica*, during late hatchery and early field culturing. *J World Aquac Soc* 41:447-454. doi:10.1111/j.1749-7345.2010.00386.x
 33. Campa-Córdova AI, Luna-González A, Ascencio F, Cortés-Jacinto E, Cáceres-Martínez CJ (2006) Effects of chloramphenicol, erythromycin, and furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis*. *Aquaculture* 260:145-150. <https://doi.org/10.1016/J.Aquaculture.2006.06.014>
 34. Grossart HP, Czub G, Simon M (2006) Algae–bacteria interactions and their effects on aggregation and organic matter flux in the sea. *Environmental Microbiol* 8:1074-1084. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.00999.x
 35. Grossart HP, Simon M (2007) Interactions of planktonic algae and bacteria: effects on algal growth and organic matter dynamics. *Aquat Microb Ecol* 47:163-176. doi:10.3354/ame047163
 36. Toi HT, Boeckx P, Sorgeloos P, Bossier P, Van Stappen G (2014) Co-feeding of microalgae and bacteria may result in increased N assimilation in *Artemia* as compared to mono-diets, as demonstrated by a 15N isotope uptake laboratory study. *Aquaculture* 422–423:109-114. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.005>
 37. De Paiva-Maia E, Alves-Modesto G, Otavio-Brito L, Olivera A, Vasconcelos-Gesteira TC (2013) Effect of a commercial probiotic on bacterial and phytoplankton concentration in intensive shrimp farming (*Litopenaeus vannamei*) recirculation systems. *Lat Am J Aquat Res* 41:126-137. <https://doi.org/10.3856/vol41-issue1-fulltext-10>
 38. Pacheco-Vega JM, Cadena-Roa MA, Leyva-Flores JA, Zavala-Leal OI, Pérez-Bravo E, Ruiz-Velazco JMJ (2018) Effect of isolated bacteria and microalgae on the biofloc characteristics in the Pacific white shrimp culture. *Aquac Report*. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2018.05.003>
 39. Subashchandrabose SR, Ramakrishnan B, Megharaj M, Venkateswarlu K, Naidu R (2011) Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnol Adv* 29:896-907. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.009>
 40. Molina-Cárdenas CA, Sánchez-Saavedra MP (2017) Inhibitory effect of benthic diatom species on three aquaculture pathogenic vibrios. *Algal Res* 27:131-139. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.004>
 41. Nemutanzhela ME, Roets Y, Gardiner N, Lalloo R (2014) The use and benefits of *Bacillus* based biological agents in aquaculture. In: Hernandez-Vergara M. (ed.) Sustainable aquaculture techniques. Murcia Spain.
 42. Timmerman H, Koning C, Mulder L, Rombouts F, Beynen A (2004) Monostrain, multistain and multispecies probiotics—a comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol* 96(3):219-233.

43. Cutting SM (2011) *Bacillus probiotics*. Food Microbiol 28(2):214-220.
44. Luis-Villaseñor IE, Macías-Rodríguez ME, Gómez-Gil B, Ascencio-Valle F, Campa-Córdova ÁI (2011) Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 321:136-144. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.036>
45. Setyati WA, Martani E, Zainuddin M (2014) Selection, identification and optimization of the growth water probiotic consortium of mangrove ecosystems as bioremediation and biocontrol in shrimp ponds. JPHPI 17(3):243-253. doi.org/10.17844/jphpi.v17i3.8913
46. Newaj-Fyzul A, Al-Harbi AH, Austin B (2014) Review : Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aquaculture 431:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.026>
47. Aly SM, Abdel-Galil Ahmed Y, Abdel-Aziz Ghareeb A, Mohamed MF (2008) Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish Shellfish Immunol 25: 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.013>
48. Zokaeifar H, Balcázar JL, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A, Nejat N (2012) Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol 33:683-689. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.027>
49. Dhama K, Tiwari R, Khan RU, Chakraborty S, Gopi M, Karthik K, Saminathan M, Desingu PA, Sunkara LT (2014) Growth promoters and novel feed additives improving poultry production and health, bioactive principles and beneficial applications: the trends and advances-A review. Int J Pharmacol 10:129-159.
50. Silva-Aciáres F, Moraga D, Auffret M, Tanguy A, Riquelme C (2013) Transcriptomic and cellular response to bacterial challenge (pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*) in farmed juvenile *Haliotis rufescens* fed with or without probiotic diet. J Invertebr Pathol 113:163-176. [doi:10.1016/j.jip.2013.03.004](https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.03.004).

Alternativas de Acuicultura Sostenible: Aspectos Nutricionales

Luis Rafael Martínez Córdova¹; Marcel Martínez Porchas^{2*}; Glen Ricardo Robles Porchas² y Estefanía Garibay Valdez².

¹DICTUS, Universidad de Sonora. Luis Donaldo Colosio s/n, entre Reforma y Sahuaripa, Edificio 7G. c.p 83000, Hermosillo, Sonora.

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46, Col. La Victoria, c.p. 83304, Hermosillo, Sonora.

*Autor de correspondencia: marcel@ciad.mx

Resumen

En el presente documento se presentan algunas de las alternativas de acuicultura sostenible que se han probado o se están probando exitosamente en el mundo, destacando especialmente los aspectos nutricionales. Los datos presentados provienen tanto de una exhaustiva revisión bibliográfica como de las experiencias de nuestro cuerpo académico Biotecnología y Sustentabilidad Acuícolas. Se destaca primordialmente el aprovechamiento de fuentes no convencionales de alimentación, sobre todo, de microorganismos fotoautótrofos y heterótrofos. Se aborda, de manera particular, la incorporación de microorganismos inmovilizados, tanto producidos exógenamente como producidos *ex situ* e incorporados directamente al sistema o en el alimento; además, se aborda el uso de microalgas inmovilizadas en el sistema de cultivo o incorporadas al alimento y, finalmente, un novedoso sistema llamado FLOCPONICS.

Las evidencias indican que los aspectos nutricionales se encuentran entre los factores que mayormente contribuyen a la sustentabilidad de la actividad acuícola. Los microorganismos de diverso origen y proporcionados de maneras diversas, contribuyen a la nutrición de organismos acuícolas y al mejoramiento del sistema de cultivo.

Palabras clave: *Acuicultura sostenible; Producción integrada; Microorganismos en acuicultura*

Introducción

La importancia y contribución de la acuicultura a nivel mundial en el suministro de alimentos saludables y accesibles, creación de empleos dignos, generación de divisas y empresas exitosas, está suficientemente documentada (Strankus, *et al.*, 2021), contribuyendo de manera significativa al desarrollo regional en diversos países del mundo, incluyendo México.

A pesar de estas evidentes ventajas, la actividad es continuamente criticada por provocar diversos impactos negativos tales como: deterioro ambiental, competencia por agua y tierras con otros sectores, diseminación de patógenos, entre otros (Martínez-Córdova *et al.*, 2009).

Ante este panorama, es importante que la producción de alimentos, no solamente de la acuicultura sino de cualquier actividad productiva, se haga de manera sostenible. Para ello es necesario que la investigación, la legislación y las políticas de gobierno tomen en cuenta: a los organismos, al ambiente y a la sociedad.

¿Acuicultura Sostenible?

Se ha cuestionado constantemente si la acuicultura puede ser una actividad sostenible. De acuerdo con las experiencias de diversos investigadores y productores, incluyendo las de nuestro grupo de trabajo, la respuesta es **SÍ**. Para ello, es necesario abordar y superar adecuadamente varios aspectos incluyendo suficiente investigación en los aspectos involucrados para que sean la base de la legislación y las políticas de manejo (Boyd *et al.*, 2020). Es fundamental que la actividad se desarrolle con un sentido más holístico, considerando el aspecto ecológico (que sea ambientalmente amigable), el económico (que sea económicamente rentable) y el social (que contribuya al desarrollo regional).

Algunos asuntos particulares que se deben superar son los siguientes:

- Uso eficiente del agua

- Aprovechamiento eficiente de los nutrientes (insumos, alimentos)

- Uso adecuado de los servicios ecosistémicos

- Disminución de efluentes y contaminantes

- Medidas de bioseguridad (especialmente para manejo de enfermedades)

- Mejoramiento de la productividad

El problema de abasto de agua y la competencia de la acuicultura con otros usuarios del recurso, es un asunto muy grave en algunas regiones, sobre todo, áridas y semiáridas. Es

entonces prioritario efficientizar su uso con acciones tales como la reducción o eliminación del recambio, re-uso de los efluentes para el mismo cultivo o cultivo de otros organismos animales o vegetales (hidroponia y sistemas integrados).

La acuicultura en sistemas de bajo o cero recambio, ha sido ampliamente probada para varias especies de crustáceos y peces (Amhed and Turchini, 2021). Es más factible en cuerpos de agua dulce o de baja salinidad (de Jesus Gregersen, *et al.*, 2021) y menos eficiente en agua salada o hipersalina, en donde la salinidad puede elevarse a niveles inadecuados y peligrosos. En este tipo de sistemas es muy importante tener alternativas para mantener los niveles de oxígeno en los rangos adecuados. Se ha demostrado que con este tipo de cultivos se puede optimizar el uso de nutrientes al permanecer durante más tiempo dentro del sistema, lo que, a su vez, puede disminuir el factor de conversión alimenticia (FCA).

En el mismo contexto, los sistemas de recirculación efficientizan el uso de agua y minimizan descargas, optimizan el uso de nutrientes, disminuyen costos relacionados sobre todo con el bombeo y pueden mejorar la productividad y rentabilidad del sistema.

Existen casos exitosos de este tipo de sistemas; por ejemplo, un estudio llevado a cabo por Yogev *et al* (2017), que consistió en un sistema de recirculación para cultivo de peces integrado a un filtro de sólidos, biopelícula nitrificadora, lodos activados y biorreactor anaeróbico. Se logró una reducción de carbono y nitrógeno orgánico en la columna de agua, la obtención de biogas y se mejoró el FCA. Alrededor de 50% de carbón proveniente del alimento fue recuperado por los peces para crecimiento y respiración; y otro 10% por biodegradación aeróbica en el reactor de nitrificación.

Hay diversas estrategias para lograr el uso eficiente de nutrientes en acuicultura y contribuir con ello a la sostenibilidad de la actividad. Entre ellas, las ya mencionadas de uso de bajo recambio y recirculación; adicionalmente, el uso de alimentos con formulaciones y digestibilidad adecuadas que tomen en cuenta: la especie, estadio de desarrollo (Baruah *et al.*, 2017), condiciones del cultivo, empleo de estrategias eficientes de alimentación, aprovechamiento de alimento natural, policultivos y sistemas Integrados (Martínez-Córdova & Martínez-Porchas, 2010).

Específicamente enfocándonos en el aprovechamiento del alimento natural, hemos documentado en presentaciones anteriores los beneficios de esta estrategia. Está más que probado que la productividad natural contribuye con un alto porcentaje a la nutrición de

diversos organismos acuícolas, sobre todo en sistemas menos intensificados. Se ha visto que, en este tipo de sistemas, aunque no es del todo fácil, resulta factible incentivar y manejar comunidades de fitoplancton, zooplancton y bentos (Martinez-Córdova *et al.*, 2002). Sin embargo, en sistemas más intensificados, la dificultad se incrementa y resulta mucho más factible el manejo de microorganismos, ya sea foto-autotróficos y/o heterotróficos.

El beneficio de los microorganismos adecuadamente utilizados ha sido demostrado en una gran cantidad de estudios y en diversas especies, sobre todo de peces y crustáceos. Estos beneficios se reflejan en aspectos tales como: respuesta productiva, mejoramiento o al menos mantenimiento de la calidad del agua, mejoramiento de la condición fisiológica y estado inmune y mejoramiento de la actividad digestiva y calidad postcosecha (Deng *et al.*, 2021).

Hay varias maneras en que los microorganismos pueden ser utilizados en la acuicultura, por ejemplo: producidos o incorporados directamente en la columna de agua (sobre todo para el mejoramiento de la calidad del agua), incentivados e inmovilizados dentro del sistema de cultivo (*in situ*), producidos externamente e incorporados al sistema (*ex situ*); producidos, cosechados e incorporados en los alimentos acuícolas.

Para la producción de consorcios microbianos *in situ* (bioflocs y biopelículas) se proporcionan las condiciones dentro del sistema para promover organismos benéficos, incluyendo el mantenimiento de las variables ambientales dentro de rangos adecuados; se maneja la proporción de nutrientes, sobre todo C:N en las tasas adecuadas para promover efectivamente el tipo de organismos que se desean; se pueden o no utilizar sustratos flotantes o fijos (Schveitzer *et al.*, 2013).

Los organismos cultivados consumen la biomasa microbiana. Algunos son capaces de consumir eficientemente los microorganismos libres en la columna de agua; sin embargo, la mayoría solo puede hacerlo cuando están inmovilizados en superficies fijas (biopelículas) o en sustratos flotantes (bioflóculos).

Están documentados múltiples casos de éxito con el uso de la tecnología BFT (Emerenciano *et al.*, 2017). Un ejemplo es la remoción de compuestos nitrogenados en la columna de agua, como se muestra a continuación con datos provenientes de un estudio realizado en nuestro grupo en donde se promovieron consorcios foto-autotróficos y heterotróficos (Ortiz-Estrada *et al.*, 2021) (Figura 1).

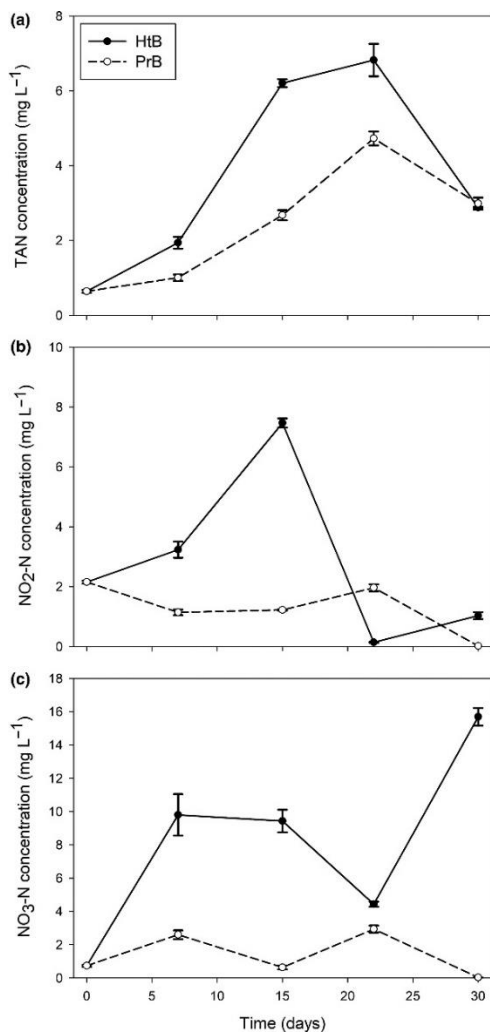


Figura 1. Nitrógeno inorgánico disuelto como (a) TAN (nitrógeno amoniacal total), (b) nitrito ($\text{NO}_2\text{-N}$), (c) nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) medido durante una prueba de 30 días. HtB (heterotrófico) y PrB (probiótico) fueron los biofilms evaluados. Los valores son medias \pm desviación estándar de muestras de agua por triplicado de ambas biopelículas evaluadas.

En el otro estudio también se detectó un efecto positivo en la respuesta productiva (especialmente el FCA) de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Becerra-Dorame *et al.*, 2012) (Tabla 1).

Tabla 1. Respuesta productiva de *L. vannamei* con la adición de consorcios microbianos autotróficos (AS), heterotróficos (HS) y control

	Supervivencia (%)	Ganancia de peso (g)	Biomasa total (g m ⁻³)	FCA	SGR% semanal ⁻¹
C	39.6 ± 2.87 ^b	1.58 ± 0.31 ^a	417.6 ± 16.5 ^b	0.61 ± 0.04 ^a	51.8 ± 7.7 ^a
AS	68.0 ± 3.42 ^a	0.87 ± 0.31 ^b	475.3 ± 22.9 ^a	0.54 ± 0.03 ^b	45.0 ± 6.6 ^a
HS	68.4 ± 2.31 ^a	1.02 ± 0.35 ^b	449.4 ± 18.8 ^a	0.55 ± 0.04 ^b	46.9 ± 8.4 ^a

Literales diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P<0.05).

Resultados similares hemos obtenido con el uso de biopelículas. En un reciente estudio (en proceso de publicación), se evaluó la respuesta productiva de *L. vannamei* cultivado en presencia de tres tipos de biopelículas: una formada a partir de un consorcio microbiano inespecífico de origen marino (BMC), una segunda formada a partir de diatomea la *Navicula incerta* (BFA) y una tercera que se elaboró a partir de un probiótico comercial (BPC). Los resultados mostraron que los parámetros productivos en todos los tratamientos fueron superiores a los obtenidos en el control sin biopelículas (Tabla 2).

Tabla 2. Respuesta productiva de camarones alimentados con consorcios microbianos de diferente origen. BMC (consorcio microbiano marino); BFA (Microalgas) y BPC (probiótico comercial).

Parámetros	Control	BMC	BFA	BPC
Peso inicial (g)	6.1 ± 0.3	6.3 ± 0.1	6.1 ± 0.2	5.34 ± 0.7
Peso final (g)	9.4 ± 0.8	11.9 ± 0.6	10.6 ± 1	9.4 ± 1.0
Peso ganado (g)	3.3 ± 0.5	5.6 ± 0.5	4.4 ± 0.9	4.0 ± 0.8
Peso ganado (%)	54.4 ± 6.4	88.6 ± 7.9	72.8 ± 13.8	75.4 ± 20.2
Biomasa (g)	8.7 ± 5.8	58.3 ± 8.0	60.2 ± 15.3	58.0 ± 14.8
Supervivencia (%)	68.7 ± 17.3	77.5 ± 2.5	85.8 ± 14.4	87.9 ± 10.4

Adicionalmente, se evaluaron los efectos de estos consorcios en la expresión de genes en camarón, relacionados a la actividad digestiva y condición inmune y se encontró un efecto

significativo en la expresión de tripsina, quimotripsina, catalasa y profenol oxidasa (Figura 2).

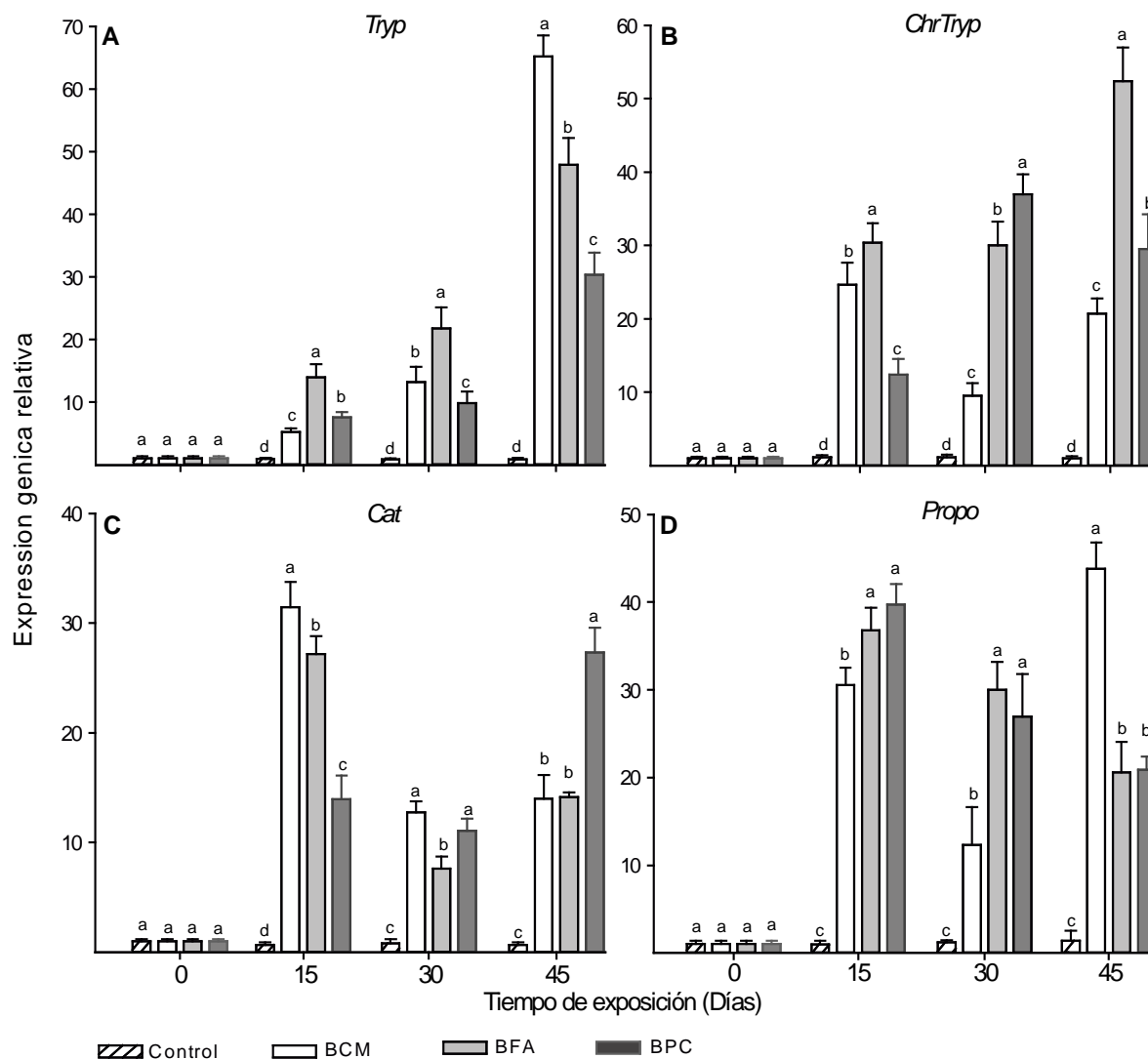


Figura 2. Expresión relativa de tripsina, quimotripsina, catalasa y profenol oxidasa en camarones alimentados con consorcios microbianos de diferente origen. BMC (consorcio microbiano marino); BFA (Microalgas) y BPC (probiótico comercial).

En concordancia con nuestros resultados, Ekasari *et al.* (2013), reportaron un efecto positivo de los consorcios microbianos en la condición inmune de camarones cuya alimentación se complementó con bioflocs producidos con diferentes fuentes de carbón. En este estudio se comparó la cuenta de hemocitos totales (THC) y los niveles de fenoloxidasa (PO) y estallido

respiratorio (RB), antes y después de un reto con *Vibrio parahaemolyticus*, encontrando que los valores de los tres parámetros cambiaron significativamente en diferentes proporciones relacionadas con la fuente de carbono (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros de condición inmune de *L. vannamei* en BFT utilizando diferentes fuentes de carbón, antes y después de retarlos con *Vibrio parahaemolyticus*.

TRATAMIENTO	PRE-RETO		POST RETO	
	CHT (x 10 ⁶ cel/mL)	PO (OD 408 100 L ⁻¹ □)	CHT (x 10 ⁶ cel/mL)	PO (OD 408 100 L ⁻¹ □)
Control Positivo	11.90	160	11.68	0.15
Control negativo			6.81	0.07
Melaza	12.03	0.49	6.80	0.09
Tapioca	16.61	0.60	5.10	0.19
Sub. Tapioca	16.21	0.28	7.15	0.13
Salvado arroz	15.08	0.44	6.50	0.13

CHT (conteo hemocitos totales); PO (Fenol oxidasa).

Adicionalmente, hemos documentado que la incorporación de consorcios microbianos promovidos a partir de las diferentes fuentes de microorganismos no afecta la calidad post-cosecha de los organismos cultivados y que, inclusive, algunos indicadores de dicha calidad pueden mejorar en alguna medida; por ejemplo, la firmeza, que es una característica deseable fue mayor con la incorporación de consorcios foto-autotróficos, mientras que la gomosidad, que es una característica indeseable, fue menor con la incorporación de consorcios heterotróficos (Martínez-Porchas *et al.*, 2021) (Tabla 4).

Tabla 4. Variables postcosecha del camarón cocido a partir de los tratamientos y el control realizado por panelistas expertos.

	Control	Heterotrófico	Foto-Autotrófico
Olor	3.8 ± 0.4	3.7 ± 1.1	3.6 ± 0.5
Color	3.6 ± 0.6	3.0 ± 1.1	3.4 ± 0.5
Consistencia	4.2 ± 0.4	3.6 ± 0.8	4.0 ± 0.7
Jugosidad	4.0 ± 1.0	3.6 ± 0.8	4.0 ± 0.7
Firmeza	4.2 ± 0.8	3.6 ± 0.5	4.4 ± 0.5
Gomosidad	3.4 ± 1.3	3.0 ± 0.5	3.8 ± 0.5
Promedio	3.7 ± 0.7	3.4 ± 0.6	3.8 ± 0.5

La producción de consorcios microbianos *ex situ* es actualmente una práctica común a nivel mundial (Wei *et al.*, 2020), tanto para el cultivo de camarones como de peces (Menaga *et al.*, 2019). Para ello, se utilizan diversos tipos de unidades de producción fuera del sistema, en donde se proporcionan las condiciones para el desarrollo del tipo de comunidad que se desee

promover: foto-autotrófica, heterotrófica o mixotrófica. Los bioflocs (y también las biopelículas) pueden ser suministradas directamente en fresco, secados por diferentes medios y luego incorporadas al sistema o bien, ser secados e incorporadas al alimento suplementario. La composición de los bioflocs puede variar significativamente dependiendo de diversos factores tales como condiciones ambientales, proporción de nutrientes, tipo de organismos promovidos, composición de la dieta, entre otros. Un estudio de Arias-Moscoso y colaboradores (2016) reportó la composición de bioflocs producidos en un cultivo intensivo de camarón blanco. Se reportó que los niveles de proteína fueron altos, inclusive en aquellos tratamientos que utilizaron dietas de bajo nivel proteico, demostrando que los consorcios microbianos son una importante fuente de nutrientes, incluyendo lípidos y proteína (Tabla 5).

Tabla 5. Composición proximal de bioflocs en cultivos de camarones alimentados con dietas con diferente nivel proteico.

	Tratamientos (Nivel de proteína en la dieta en g/kg)			
	0	100	200	300
Proteínas	364 ± 83	404 ± 55	389 ± 42	394 ± 35
Lípidos	8 ± 5	6 ± 1	6 ± 1	7 ± 4
Fibra	9 ± 5	7 ± 5	6 ± 2	5 ± 3

Los beneficios de estas prácticas han sido ampliamente documentados en diversas publicaciones. Un reciente estudio de Binalshikh-Abubkr y Mohd Hanafiah, M. (2022), reporta que la incorporación de bioflóculos (secados al horno o liofilizados) en el alimento en una proporción de 4 %, no representó problemas en el crecimiento de tilapia; sin embargo, cuando la incorporación fue de 16 %, el crecimiento disminuyó ligeramente. El contenido proteico de los peces fue ligeramente mayor en aquellos en que se incorporaron bioflocs liofilizados al 4 %. Menaga *et al.* (2019), reportan el efecto de bioflocs producidos *in situ* y *ex situ* en la condición inmune y antioxidante de tilapia (Figura 3).

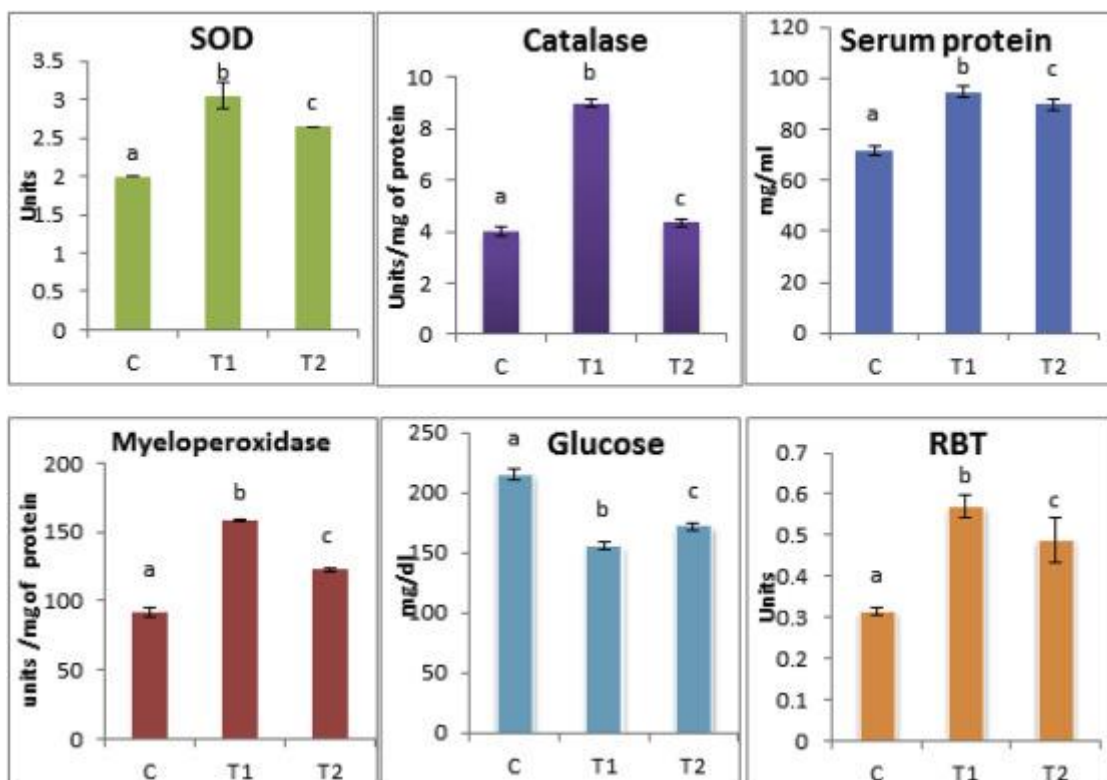


Figura 3. Indicadores inmunológicos y antioxidantes de la tilapia GIFT en diversos tratamientos. *In situ* (T1), *ex situ* (T2).

Los bioflóculos tanto *in situ* como *ex situ* se pueden promover con o sin la incorporación de sustratos flotantes. Sin embargo, en nuestra experiencia, la producción es más efectiva utilizando sustratos. En un reciente estudio (Martinez-Cordova *et al.* 2020) se evaluaron dos sustratos: semillas de amaranto y salvado de trigo en la formación efectividad de bioflocs para la alimentación de camarón. En ambos casos la respuesta productiva fue mejor que la obtenida en el control sin sustratos (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros productivos de *L. vannamei* en sistema BFT utilizando dos tipos de sustratos flotantes.

	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Sobrevivencia (%)	Biomasa final (g)	FCA
Amaranto	1.3 ± 0.1	33 ± 2	86 ± 12	338 ± 5.0	1.6 ± 0.2
Salvado	1.3 ± 0.1	37 ± 4	100 ± 0	445 ± 4.8	1.2 ± 0.1

Hemos incursionado también en aspectos más profundos, tales como la caracterización taxonómica de la microbiota intestinal de organismos cultivados, sus modificaciones longitudinales y temporales, así como en la predicción de su perfil funcional (Vargas-Albores *et al.*, 2021; Garibay-Valdez *et al.*, 2021). Todo esto tiene una estrecha relación con la función digestiva y, desde luego, con la respuesta productiva de los organismos cultivados, como ha sido ampliamente documentado en diversas publicaciones (Zeng *et al.*, 2019; Ortiz-Estrada *et al.*, 2019) (Figuras 4-6). Una de las hipótesis es que algunos de los microorganismos presentes en bioflóculos y biopelículas, pasan a formar parte del tracto digestivo del camarón, aportando funciones metabólicas, inmunes e incluso de protección, tal como sucede en organismos superiores como los vertebrados.

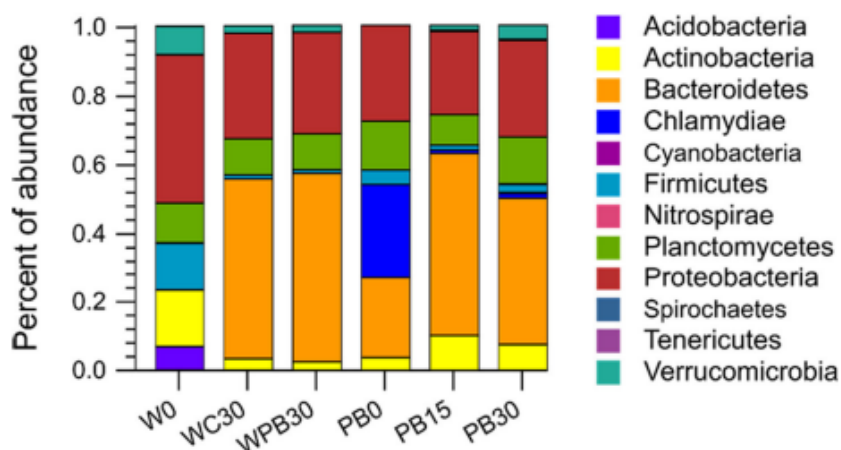


Figura 4. Porcentaje de abundancia de diversos grupos de bacterias en el agua y en el tracto digestivo de camarones en el control y en los que fueron provistos con bioflóculos fotoautotróficos, a los días 0, 15 y 30 días (Ortiz-Estrada *et al.*, 2019).

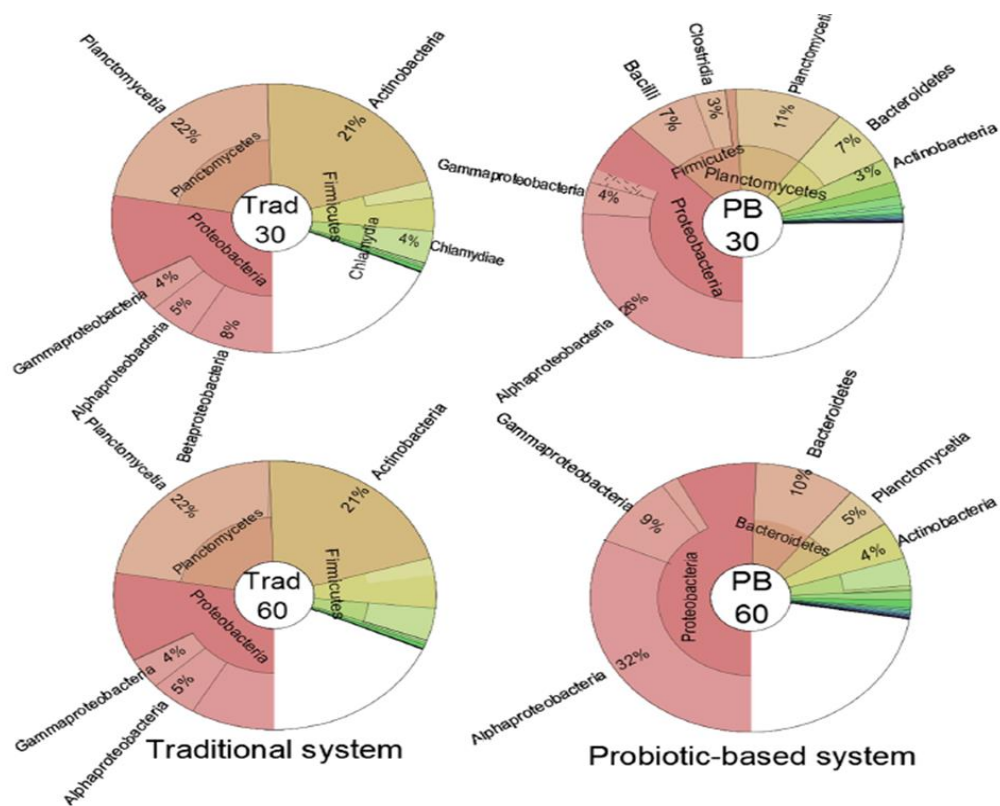


Figura 5. Composición de la biota en el tracto digestivo en el sistema tradicional y en otro con el uso de probióticos a los 30 y 60 días de cultivo (Garibay-Valdez *et al.*, 2021).

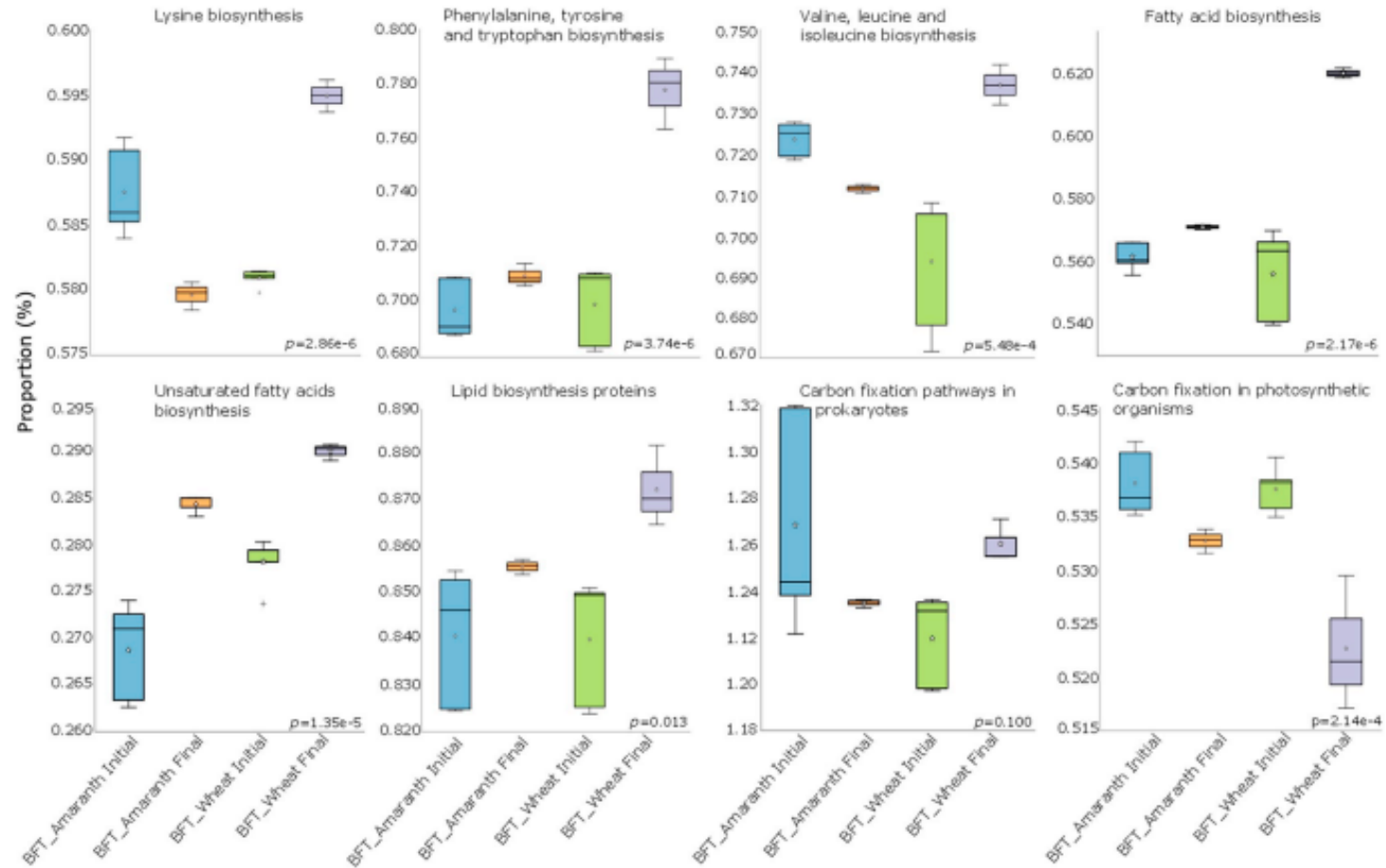


Figura 6. Predicción de algunas propiedades funcionales de la microbiota del tracto digestivo de camarones alimentados con bioflocs producidos con dos tipos de sustratos (Vargas-Albores *et al.*, 2019).

Finalmente, un concepto que se ha venido desarrollando últimamente es el de FLOCPONICS, que es la integración de sistemas de acuaponía y bioflocs.

Fimbres-Acevedo *et al.* (2019) probaron exitosamente un sistema integrado de acuaponia para el cultivo de hortalizas y tilapia, utilizando bioflocs foto-autotróficos formados a partir de la microalga *Chlorella sp.*

En el mismo sentido, Lenz *et al.* (2021) reportaron la integración de un sistema acuapónico y bioflocs para el cultivo de peces y lechuga (Figura 7). Reportaron una buena respuesta productiva de los peces.

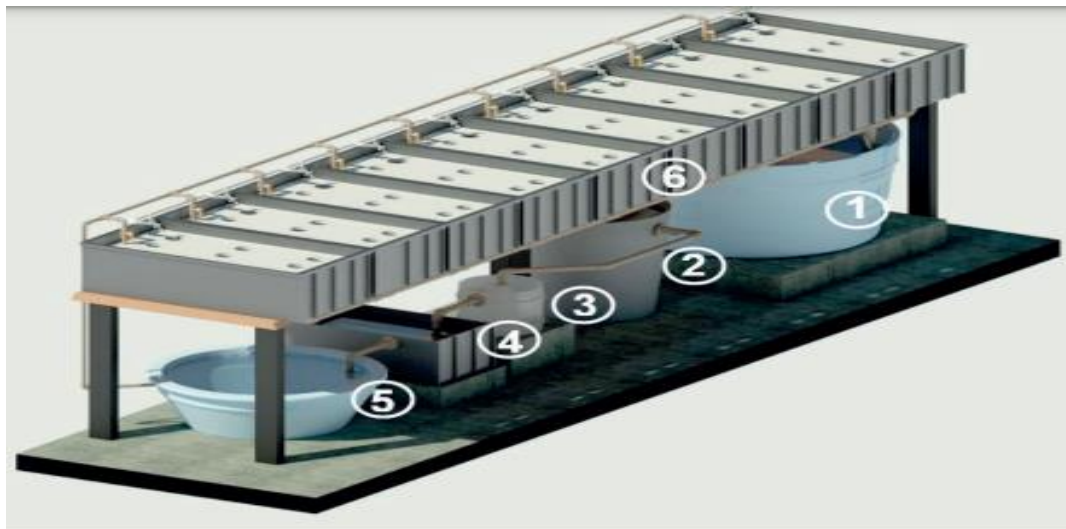


Figura 7. Sistema Floponics para cultivo de peces y lechuga (Tomada de Lenz *et al.* (2021).

Antes de que se acuñara el término floponics, nuestro grupo de trabajo logró desarrollar un sistema para el cultivo integrado de tilapia, chile jalapeño y pimientos, incorporando bioflocs para complementar la alimentación de las tilapias. Los resultados preliminares fueron prometedores en cuanto al aprovechamiento del alimento por parte de la tilapia (FCA bajos) (Tabla 7) y la utilización

eficiente de los nutrientes de los efluentes por parte de las dos especies de Chile (Martinez-Cordova *et al.*, 2019).

Tabla 7. Respuesta productiva de tilapia en un sistema Floccponics.

	PESO GANADO (g/pez)	SOBREVIVENCIA (%)	BIOMASA (g/tina)	FCA
CON BIOFLOCS	120.3 ± 26.3	82.6 ± 2.3	2969 ± 182	1.1 ± 0.1
SIN BIOFLOCS	89.7 ± 19.6	80.4 ± 1.9	2160 ± 103	1.4 ± 0.1

Conclusiones y Perspectivas

Los aspectos nutricionales son indudablemente de los más importantes para el avance de la acuicultura hacia su verdadera sostenibilidad. En este sentido, el manejo y aprovechamiento del alimento natural ha demostrado ser una estrategia viable y eficiente.

Los microorganismos constituyen una de las comunidades con mayor potencial para contribuir a la nutrición de diversos organismos acuícolas, teniendo, además, efectos positivos en la calidad del agua, en su condición inmune, en el balance de la microbiota intestinal y en la actividad enzimática digestiva.

La integración de los sistemas de bioflocs con sistemas de acuaponía, es una nueva posibilidad de avanzar hacia la sostenibilidad de la actividad acuícola.

Falta mucho por avanzar en diversos aspectos; entre otros:

- a. La caracterización más precisa de la comunidad microbiana tanto en la columna de agua, en los consorcios y en el tracto digestivo de los organismos cultivados.
- b. El manejo y manipulación de dichas comunidades, para obtener los perfiles funcionales más deseables.
- c. La combinación de diferentes comunidades (heterotróficas, foto-autotróficas o mixotróficas), simultáneamente o alternadas en el tiempo de acuerdo con las necesidades del organismo que se cultiva.

Referencias

- Ahmed, N., & Turchini, G. M. (2021). Recirculating aquaculture systems (RAS): Environmental solution and climate change adaptation. *Journal of Cleaner Production*, 126604.
- Arias-Moscoso, J. L., Cuevas-Acuña, D. A., Rivas-Vega, M. E., Martínez-Córdova, L. R., Osuna-Amarilas, P., & Miranda-Baeza, A. (2016). Physical and chemical characteristics of lyophilized biofloc produced in whiteleg shrimp cultures with different fishmeal inclusion into the diets. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(4), 769-778.
- Baruah, K., Norouzitallab, P., & Pal, A. K. (2017). Development of low cost and eco-friendly feed for various candidate species for the sustainability of commercial aquaculture and reduction of aquatic pollution. In *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products* (pp. 441-453). Academic Press.
- Becerra-Dorame, M. J., Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L. R., Rivas-Vega, M. E., Lopez-Elias, J. A., & Porchas-Cornejo, M. A. (2012). Production response and digestive enzymatic activity of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) intensively pregrown in microbial heterotrophic and autotrophic-based systems. *The Scientific World Journal*, 2012.
- Becerra-Dorame, M. J., Martinez-Cordova, L. R., Martínez-Porchas, M., Hernández-López, J., López-Elías, J. A., & Mendoza-Cano, F. (2014). Effect of using autotrophic and heterotrophic microbial-based-systems for the pre-grown of *Litopenaeus vannamei*, on the production performance and selected haemolymph parameters. *Aquaculture Research*, 5(45), 944-948.
- Binalshikh-Abubkr, T., & Mohd Hanafiah, M. (2022). Effect of Supplementation of Dried Bioflocs Produced by Freeze-Drying and Oven-Drying Methods on Water Quality, Growth Performance and Proximate Composition of Red Hybrid Tilapia. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(1), 61.
- Boyd, C. E., D'Abramo, L. R., Glencross, B. D., Huyben, D. C., Juarez, L. M., Lockwood, G. S., ... & Valenti, W. C. (2020). Achieving sustainable aquaculture: Historical and current perspectives and future needs and challenges. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(3), 578-633.
- de Jesus Gregersen, K. J., Pedersen, L. F., Pedersen, P. B., Syropoulou, E., & Dalsgaard, J. (2021). Foam fractionation and ozonation in freshwater recirculation aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 95, 102195.
- Deng, Y., Chen, F., Liao, K., Xiao, Y., Chen, S., Lu, Q., ... & Zhou, W. (2021). Microalgae for nutrient recycling from food waste to aquaculture as feed substitute: a promising pathway to eco-friendly development. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*.
- Ekasari, J., Azhar, M., Surawidjaja, E., De Schryver, P., & Bossier, P. (2013). The effects of bioflocs grown on different carbon sources on shrimp immune response and disease resistance. In *Biofloc Technology and Shrimp Disease Workshop*.
- Ekasari J, Azhar MH, Surawidjaja EH, Nuryati S, De Schryver P, Bossier P (2014) Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. *Fish Shellfish Immunol* 41:332–339.
- Emerenciano, M. G. C., Martínez-Córdova, L. R., Martínez-Porchas, M., & Miranda-Baeza, A. (2017). Biofloc technology (BFT): a tool for water quality management in aquaculture. *Water quality*, 5, 92-109.

- Fimbres-Acedo, Y. E., Servín-Villegas, R., Garza-Torres, R., Endo, M., Fitzsimmons, K. M., Emerenciano, M. G., ... & Magallón-Barajas, F. J. (2020). Hydroponic horticulture using residual waters from *Oreochromis niloticus* aquaculture with biofloc technology in photoautotrophic conditions with *Chlorella* microalgae. *Aquaculture Research*, 51(10), 4340-4360.
- Garibay-Valdez, E., Cicala, F., Martínez-Porchas, M., Gómez-Reyes, R., Vargas-Albores, F., Gollas-Galván, T., ... & Calderón, K. (2021). Longitudinal variations in the gastrointestinal microbiome of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *PeerJ*, 9, e11827.
- Lenz, G.L., Lapa, K.R., Viana, M.L. and Coelho Emerenciano, M.G. (2019). Preliminary characterization of solids in the water of an integrated aquaponic and biofloc system. *Arq. Ciên. Mar.*, 54 (2): 103 – 119.
- Martínez-Córdova, L. R., Campaña-Torres, A., & Porchas-Cornejo, M. A. (2002). Promotion and contribution of biota in low water exchange ponds farming blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson). *Aquaculture Research*, 33(1), 27-32.
- Martínez-Córdova, L. R., Martínez Porchas, M., & Cortés-Jacinto, E. (2009). Mexican and world shrimp aquaculture: sustainable activity or contaminant industry?. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(3), 181-196.
- Martínez-Córdova, L. R., López-Elías, J., & Martínez-Porchas, M. (2020). A preliminary evaluation of an integrated aquaculture-agriculture systems (tilapia and peppers) at mesocosm scale. *J Aquac Mar Biol*, 9(1), 19-22.
- Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L. R., Porchas-Cornejo, M. A., & López-Elías, J. A. (2010). Shrimp polyculture: a potentially profitable, sustainable, but uncommon aquacultural practice. *Reviews in Aquaculture*, 2(2), 73-85.
- Martínez-Porchas, M., Ezquerro-Brauer, M., Mendoza-Cano, F., Higuera, J. E. C., Vargas-Albores, F., & Martínez-Córdova, L. R. (2020). Effect of supplementing heterotrophic and photoautotrophic biofloc, on the production response, physiological condition and post-harvest quality of the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 16, 100257.
- Menaga, M., Felix, S., Charulatha, M., Gopalakannan, A., & Panigrahi, A. (2019). Effect of in-situ and ex-situ biofloc on immune response of Genetically Improved Farmed Tilapia. *Fish & shellfish immunology*, 92, 698-705.
- Ortiz-Estrada, Á. M., Gollas-Galván, T., Martínez-Córdova, L. R., Burgos-Hernández, A., Scheuren-Acevedo, S. M., Emerenciano, M., & Martínez-Porchas, M. (2019). Diversity and bacterial succession of a phototrophic biofilm used as complementary food for shrimp raised in a super-intensive culture. *Aquaculture International*, 27(2), 581-596.
- Ortiz-Estrada, Á. M., Gollas-Galván, T., Martínez-Córdova, L. R., & Martínez-Porchas, M. (2019). Predictive functional profiles using metagenomic 16S rRNA data: a novel approach to understanding the microbial ecology of aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture*, 11(1), 234-245.
- Ortiz-Estrada, Á. M., Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L. R., Vargas-Albores, F., Burgos-Hernández, A., Scheuren-Acevedo, S. M., & Gollas-Galván, T. (2021). Bacterial communities and predicted nitrogen metabolism of heterotrophic-and probiotic-based biofilms used for super-intensive indoor shrimp culture. *Aquaculture Research*, 52(1), 334-344.

- Stankus, A. (2021). State of world aquaculture 2020 and regional reviews: FAO webinar series. FAO Aquaculture Newsletter, (63), 17-18.
- Schveitzer, R., Arantes, R., Baloi, M. F., Costódio, P. F. S., Arana, L. V., Seiffert, W. Q., & Andreatta, E. R. (2013). Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Biofloc System) at different stocking densities: Effects on microbial activity, water quality and production rates. Aquacultural Engineering, 54, 93-103.
- Vargas-Albores, F., Porchas-Cornejo, M.A., Martínez-Porchas, M., Villalpando-Canchola, E. Gollas-Galva, T. and Martínez-Córdova, L.R. (2009) Bacterial biota of shrimp intestine is significantly modified by the use of a probiotic mixture: a high throughput sequencing approach. Revista de Biología Marina y Oceanografıa 44(2): 335-342.
- Vargas-Albores, F., Martínez-Córdova, L. R., Gollas-Galván, T., Garibay-Valdez, E., Emerenciano, M. G. C., Lago-Leston, A., ... & Martínez-Porchas, M. (2019). Inferring the functional properties of bacterial communities in shrimp-culture bioflocs produced with amaranth and wheat seeds as fouler promoters. Aquaculture, 500, 107-117.
- Wei, Y. F., Wang, A. L., & Liao, S. A. (2020). Effect of different carbon sources on microbial community structure and composition of ex-situ biofloc formation. Aquaculture, 515, 734492.
- Yogev, U., Sowers, K. R., Mozes, N., & Gross, A. (2017). Nitrogen and carbon balance in a novel near-zero water exchange saline recirculating aquaculture system. Aquaculture, 467, 118-126.
- Zeng, S., Huang, Z., Hou, D., Liu, J., Weng, S., & He, J. (2017). Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. PeerJ, 5, e3986.

Habilidad de Tres Especies de Peces Tropicales de Hábitos Carnívoros para Utilizar Carbohidratos: Robalo blanco (*Centropomus undecimalis*), Mero rojo (*Epinephelus morio*) y Pargo canané (*Ocyurus chrysurus*)

Martín Arenas, Alvaro Barreto, Gabriela Gaxiola

Unidad Multidisciplinaria de docencia e Investigación (UMDI) Sisal, Facultad de Ciencias,

UNAM, México. E-mail: arenas.pardo@gmail.com, alvarobarreto09@gmail.com

mggc@ciencias.unam.mx

Resumen

El robalo blanco (*Centropomus undecimalis*), mero rojo (*Epinephelus morio*) y pargo canané (*Ocyurus chrysurus*) son peces de hábitos carnívoros con potencial para ser cultivados, son importantes comercial y recreativamente en el Golfo de México. Los avances en la investigación sobre los requerimientos nutricionales para el desarrollo de alimentos balanceados en estas especies reportan un alto requerimiento de proteína en el alimento (40-50%). Por lo tanto, la habilidad de estas especies de peces para utilizar carbohidratos (20%, almidón) ha sido objeto de estudio. Indicadores de eficiencia alimenticia, utilización metabólica y regulación del metabolismo digestivo e intermediario de la glucosa son discutidos en este escrito. El robalo blanco y pargo canané se adaptan digestivamente a los carbohidratos, pero no el mero rojo. El pargo canané experimenta condiciones agudas de hiperglucemia en estado postprandial en comparación con las otras especies. Las tres especies de peces exhiben un incremento en el potencial de glucolisis y reducción del potencial de gluconeogénesis después de consumir carbohidratos. El aprovechamiento nutricional de los carbohidratos por las tres especies se encuentra estrechamente relacionado con la activación de la enzima glucoquinasa (GK) o hexoquinasa IV. La concentración de carbohidratos en el alimento es un factor determinante en la activación de la enzima GK. El robalo blanco presenta una mayor habilidad para aprovechar nutricionalmente los carbohidratos en comparación con el mero rojo y pargo canané.

Palabras clave: peces carnívoros, carbohidratos, metabolismo digestivo e intermediario.

1. Introducción

La proteína es por lo general el mayor componente dietético en la formulación de alimentos balanceados para peces en la acuicultura, particularmente para las especies con hábitos carnívoros (Hua *et al.*, 2019). La demanda de proteína en los alimentos balanceados por los peces varía entre 24 y 70%, dependiendo de la etapa de vida, nivel trófico, salinidad y temperatura del agua (Oliveira *et al.*, 2020). En peces, la proteína además de ser necesaria para propósitos plásticos (crecimiento, mantenimiento, reparación de tejido), síntesis de enzimas, hormonas y otros metabolitos, cumplen funciones energéticas (NRC, 2011). La proteína es considerada el sustrato primario de los peces para la obtención de energía, aproximadamente el 80% de la producción total de adenosín trifosfato (ATP) en peces proviene del catabolismo de proteína (Cowey & Walton, 1988; Jia *et al.*, 2017). El uso de la proteína con fines energéticos por los peces en la acuicultura es indeseable debido a su alto costo en comparación con otros componentes dietéticos altamente energéticos como son los lípidos y carbohidratos (NRC, 2011). Por otra parte, la liberación de amonio, producto directo del catabolismo de la proteína, impacta negativamente el medio ambiente, debido a que es uno de los principales componentes nitrogenados responsables de la eutrofización del agua (Van Waarde, 1983). El catabolismo de proteína con fines energéticos es inevitable en peces, pero puede reducirse con un nivel de inclusión apropiado de energía digestible no proteica reemplazado por carbohidratos, un efecto comúnmente referido como ahorro de proteína (NRC, 2011).

2. Generalidades del uso de carbohidratos en peces

Los carbohidratos son la fuente de energía dietética más barata en vertebrados terrestres (Wilson, 1994). En peces, no existe un requerimiento de carbohidratos debido a su eficiente habilidad para sintetizar glucosa a partir de precursores de origen proteínico y lipídico (glicerol, piruvato, aminoácidos y lactato (Enes *et al.*, 2009). Por otra parte, en algunos peces se ha observado que un nivel de inclusión adecuado de carbohidratos en la formulación de alimentos balanceados reduce el catabolismo de proteína con fines energéticos (ahorro de proteína), lo cual a su vez promueve la retención de proteína con fines de crecimiento (NRC, 2011). Sin embargo, la habilidad de los peces para utilizar los carbohidratos es limitada con respecto a los vertebrados terrestres (Panserat *et al.*, 2014), estos experimentan prolongados periodos de hiperglicemia después de consumir carbohidratos, especialmente las especies con hábitos carnívoros, a pesar de poseer un sistema

homeostático de glucosa activo (Polakof *et al.*, 2012). Las bases fisiológicas de la aparente intolerancia de glucosa en los peces es un tema polémico complicado por la extrema diversidad de hábitos alimenticios, hábitats, características anatómicas y fisiológicas (Kamalam *et al.*, 2017).

(Varias hipótesis) han sido propuestas varias hipótesis para tratar de explicar la baja habilidad de algunos peces para utilizar la glucosa de origen dietético en comparación con otros vertebrados: 1) una baja potencia de la glucosa como secretagogo de insulina en comparación con los aminoácidos (Mommsen & Plisetskaya, 1991); 2) una baja fosforilación de glucosa en tejidos sensibles a la insulina como lo es el musculo blanco (pobre transporte de glucosa) (Navarro *et al.*, 1999; West *et al.*, 1993); (3) la ausencia de inhibición de la producción de glucosa endógena (gluconeogénesis) (Enes *et al.*, 2009; Panserat *et al.*, 2001). Polakof *et al.* (2012) sugieren que la relativa habilidad de los peces para utilizar los carbohidratos con respecto a otros vertebrados se encuentra estrechamente relacionado con su estilo de vida ectotérmico (una baja tasa metabólica y un metabolismo adaptado a largos periodos de ayuno).

3. Habilidad de los peces para utilizar carbohidratos en función de sus hábitos alimenticios

La relativa habilidad de los peces para utilizar los carbohidratos como fuente de energía varía ampliamente entre especies, pero depende de sus hábitos alimenticios (Stone, 2003; Wilson, 1994). Los peces con hábitos herbívoros y omnívoros pueden tolerar porcentajes de inclusión de carbohidratos en el alimento entre 20 y 42%, sin efectos adversos en su crecimiento o supervivencia, mientras que los porcentajes de inclusión de carbohidratos en especies con hábitos carnívoros puede variar entre 6 y 32% (Kamalam *et al.*, 2017). Los peces con hábitos herbívoros y omnívoros en comparación con los carnívoros presentan una mayor actividad de las enzimas α amilasa, sacarasa y maltasa (Harpaz & Uni, 1999; Hidalgo *et al.*, 1999), mayor tasa de absorción de glucosa en el intestino (Buddington *et al.*, 1987), mayores receptores de insulina en el músculo esquelético (Párrizas *et al.*, 1994), mejor regulación de la síntesis de glucosa endógena (gluconeogénesis) (Enes *et al.*, 2006, 2008; Panserat *et al.*, 2001) y una mayor velocidad de respuesta en la inducción de la enzima hepática glucoquinasa (GK) o hexoquinasa IV (HK IV) después de consumir carbohidratos (Boonanuntanasarn *et al.*, 2018; Panserat *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2015), lo que posiblemente explica el mejor control de la glucosa postprandial en las especies herbívoras y omnívoras, respecto a las carnívoras (Furuichi & Yone, 1981; Panserat *et al.*, 2000).

4. Descripción de las especies de estudio

4.1. Robalo blanco *C. undecimalis*.

Taxonomía

La familia *Centropomidae* se encuentra constituida por 13 especies, representadas por un solo género *Centropomus*, la cual está confinada en la zona tropical y subtropical de América. Habita ambientes costeros, salobres y dulceacuícolas, en el Atlántico Occidental se encuentran las especies: *C. undecimalis*, *C. irae*, *C. mexicanus*, *C. paralellus*, *C. poeyi*, *C. pectinatus* y *C. ensiferus*; por otra parte, en el Pacífico Oriental encontramos a *C. viridis*, *C. unionensis*, *C. robalito*, *C. medius*, *C. armatus* y *C. nigrescens* (Carvalho-Filho *et al.*, 2019; Rivas, 1986).

A continuación, se desglosa la descripción taxonómica de la familia *Centropomidae* y género *Centropomus* (Nelson, 2006).

Phylum	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Perciformes
Familia	Centropomidae
Género	<i>Centropomus</i>
Especie	<i>C. undecimalis</i> (Bloch, 1792)

Ecología

El robalo blanco es una especie hermafrodita protándrica (Taylor *et al.*, 1998), eurihalina (Perez-Pinzón & Lutz, 1991) y estenoterma (Gilmore *et al.*, 1978), la cual se distribuye geográficamente desde Carolina del Norte, Estados Unidos hasta Rio de Janeiro, Brasil, incluyendo las Bahamas, el Golfo de México y algunas islas de las Antillas. Su abundancia y distribución tiene una estrecha relación con la presencia de ambientes costeros, salobres y dulceacuícolas donde la fluctuación de salinidad va de 0 hasta 45 ppm, la salinidad es un factor importante en su distribución (Rivas, 1986).

Es un depredador visual, de hábitos carnívoros con tendencia piscívora (McMichael *et al.*, 1989), se considera un depredador oportunista debido a su alimentación en el medio natural, el cual comprende 48 taxones dentro de los cuales encontramos organismos pelágicos, demersales y bentónicos (Blewett *et al.*, 2006).

Situación pesquera

En México, las capturas de robalo blanco se reportan en conjunto con el robalo prieto (*C. poeyi*) y chucumite (*C. parallelus*), los estados con mayor captura son Campeche (33.7 %) Tabasco (28.1 %) y Veracruz (31.2 %), los estados con las menores capturas son Tamaulipas (3.3 %), Quintana Roo (1.3 %) y Yucatán (2.4 %) (SAGARPA, 2017). La pesca del robalo blanco es una de las pesquerías rivereñas más importantes en México, la cual se encuentra regulada bajo la NOM-037-PESC-2004 (SAGARPA, 2007). Sin embargo, a pesar de que existe un plan de manejo sobre la pesquería de robalos, Caballero-Chávez (2012) indica que desde el 2001 las poblaciones de robalo blanco se encuentran en estado de sobreexplotación.

4.2.Mero rojo *Epinephelus morio*

Taxonomía

El género *Epinephelus* lo componen más de 100 especies, las cuales habitan zonas tropicales y subtropicales en los mares de todo el planeta, se les encuentra asociado a condiciones de salinidades marinas

A continuación, se desglosa la clasificación taxonómica del género *Epinephelus* (Nelson, 2006).

Phylum	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Perciformes
Familia	Serranidae
Género	<i>Epinephelus</i>
Especie	<i>E. morio</i> (Valenciennes, 1828)

Ecología

El mero rojo es un pez hermafrodita secuencial con inversión hermafrodita protogínica que se distribuye desde Massachussets en EUA hasta Río de Janeiro en Brasil, sin embargo, las poblaciones más grandes de esta especie se encuentran localizadas en el Banco de Campeche, México (Giménez-Hurtado *et al.*, 2005). Su distribución espacial se encuentra asociada a la presencia de zonas de arrecifes y fondos rocosos (Moe, 1969). El mero rojo es de hábitos carnívoros, su dieta en el medio natural comprende principalmente crustáceos del tipo brachyura y estomatópodos, con menor frecuencia peces, moluscos y camarones (Brulé & Canché, 1992).

Situación pesquera

En México, particularmente en el Banco de Campeche es considerado la especie de escama más importante en explotación por flota de altura y riverena (SAGARPA, 2017). Sin embargo, desde 1986 al 2000 la captura comercial de esta especie decreció de 14, 410 a 9, 797 toneladas anuales (Giménez-Hurtado *et al.*, 2005). Arreguín-Sánchez & Arcos-Huitrón (2011) catalogó la pesca de esta especie en estado de máximo aprovechamiento con tendencia a sobrepesca. Posteriormente, en el año 2015 se publicó la NOM-065-SAG/PESC-2014 con el objetivo de regular el aprovechamiento de las especies de mero y especies asociadas en aguas de jurisdicción federal del litoral del Golfo de México y Mar Caribe, la cual establece una talla mínima de captura de 36.3 cm para el mero rojo, talla de primera madurez y reversión sexual. Recientemente, Echazabal-Salazar *et al.* (2021) reportaron que la pesquería de esta especie ha pasado de un estado de sobrepesca a sobreexplotación desde 1984 a 2014.

4.3.Pargo canané *Ocyurus chrysurus*

Taxonomía

La familia Lutjanidae está conformada por ciento y cinco especies, setenta géneros, los cuales están organizados en cuatro subfamilias. Su distribución geográfica comprende el océano Atlántico, Índico y Pacífico. Habitan zonas tropicales y subtropicales, se les encuentra en condiciones de salinidad dulce acuícolas, salobres y marinas (Cummings, 2004; de La Morinière *et al.*, 2002).

A continuación, se desglosa la clasificación taxonómica de la familia Lutjanidae y el género *Ocyurus* (Nelson, 2006).

Phylum	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Perciformes
Familia	Lutjanidea
Género	<i>Ocyurus</i>
Especie	<i>O. chrysurus</i> (Bloch, 1791)

Ecología

El pargo canané se distribuye geográficamente desde Massachusetts, Estados Unidos hasta el sureste de Brasil, es una especie de importancia comercial en el Caribe (Cumings, 2004) (Figura 5). Durante su ciclo de vida habita diferentes ambientes costeros, tamaños de tallas de 2.5 cm hasta 25 cm ocupan zonas de manglares y pastos marinos (Nagelkerken & van der Velde, 2004), por otra parte, tamaños de tallas de 25 cm hasta 35 cm ocupan zonas de arrecifes, donde alcanzan su madurez sexual y llevan a cabo su reproducción (de La Morinière *et al.*, 2002; Verweij *et al.*, 2008). El pargo canané es considerado un depredador de tipo zooplanctivo y zoobentivo, su presa principal está compuesta por peneidos, los peces son considerados como presas secundarias dentro de sus hábitos alimenticios (Rincón-Sandoval *et al.*, 2009).

Situación pesquera

Por otra parte, el pargo canané se encuentra en la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés), catalogado como “Data deficient” (Lindeman *et al.*, 2016). En México no existe un plan de manejo pesquero para esta especie. Brulé *et al.* (2008) señalan que el complejo mero-pargo, entre ellas el pargo canané, constituyen el componente principal de la pesquería de escama del estado de Yucatán. El pargo canané es considerado como pesca incidental o de acompañamiento en las pesquerías de otras especies marinas (SAGARPA, 2017), no obstante, esta pesquería se encuentra en una fase de explotación creciente (Arcos-Huitrón & Arreguín-Sánchez, 2011; Brulé *et al.*, 2008), lo anterior es alarmante debido a la ausencia de una regulación de pesca del recurso.

5. Avances en la nutrición del robalo blanco, mero rojo y pargo canané

El establecimiento de los requerimientos nutricionales en las tres especies de peces ha sido relativamente explorado, particularmente la etapa de engorda. Los requerimientos de proteína en el alimento balanceado reportados para las tres especies son relativamente similares: $\geq 50\%$ para robalo blanco y pargo canané (Concha-Frías *et al.*, 2018; Enriquez, 2018; Gracia-López *et al.*, 2003; Tucker, 1987) y $\geq 47\%$ para el mero rojo (Silva, 2017). A través de estudios de digestibilidad *in vitro* e *in vivo* se han identificaron harinas de origen vegetal y animal terrestre con potencial para ser sustitutos de la harina de pescado en la formulación de alimentos balanceados para las tres especies, entre las cuales destacan las harinas procedentes de subproductos avícolas (Barreto-Altamirano, 2016; Lemus *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2014; Silvã & Nunes, 2017). Por otra parte, en robalo blanco y mero rojo a través de un diseño bifactorial en el cual se combinaron dos niveles de proteína (aprox. 40 y 50%) con dos niveles de lípidos (aprox. 6 y 12%) en el alimento, con un mínimo contenido de carbohidratos digeribles (2%), se reportó que independientemente del nivel de proteína, el crecimiento en ambas especies fue similar cuando se alimentaron con 12% lípidos, indicando que tanto el robalo blanco como el mero rojo son capaces de reducir el catabolismo de aminoácidos con fines energético por lípidos (Arenas *et al.*, 2021a; Silva, 2017). Sin embargo, cuando se utilizó el mismo modelo nutricional con pargo canané, independientemente del contenido de lípidos, el mayor crecimiento se obtuvo cuando se alimentó con un contenido de proteína de 50% en el alimento, indicando que el metabolismo de esta especie depende altamente de la proteína (Arenas *et al.*, 2021b).

6. Nutrición de los carbohidratos en el robalo blanco, mero rojo y pargo canané

La capacidad de los peces para utilizar carbohidratos como fuente de energía depende de la compleja interacción de factores biológicos, dietéticos y ambientales (Kamalam *et al.*, 2017). A pesar de que los hábitos alimenticios (factor biológico: herbívoros > omnívoros > carnívoros) son considerados la determinante primaria en la habilidad de los peces para utilizar carbohidratos (Furuichi & Yone, 1981; Panserat *et al.*, 2000), se han reportado algunas variaciones en la habilidad del robalo blanco, mero rojo y pargo canané para utilizar carbohidratos, tres especies de hábitos carnívoros con distribución tropical-subtropical (Brulé & Canché, 1992; McMichael *et al.*, 1989; Rincón-Sandoval *et al.*, 2009).

Enzimas digestivas

La existencia de enzimas digestivas carbohidrasas, particularmente la presencia α amilasa ha sido descrita en robalo blanco, pargo canané y mero rojo, en este último ha sido reportada adicionalmente la α glucosidasa (Ahumada-Hernández *et al.*, 2014; Castillo, Callejas, *et al.*, 2018; Jimenez-Martinez *et al.*, 2012), principales enzimas encargadas de hidrolizar los enlaces alfa glucosídicos de oligosacáridos y polisacáridos (Krogdahl *et al.*, 2005). Se ha sugerido, que la actividad de las enzimas digestivas carbohidrasas se encuentra estrechamente relacionado con los hábitos alimenticios de los peces (Fernández *et al.*, 2001; Kuz'mina *et al.*, 1996). Arenas *et al.* (2021c) reportaron que la actividad *in vitro* de la enzima α amilasa en ciegos pilóricos e intestino en el pargo canané (aprox. .0.8 U/mg proteína) fue aproximadamente del doble comparado con robalo blanco (aprox. .0.4 U/mg proteína), mientras que Castillo (2018a) reportó una actividad en α amilasa utilizando el mismo método de evaluación *in vitro*, tres veces más alta en mero rojo (aprox. 2.6 U/ mg proteína) que la registrada en pargo canané. Lo anterior sugiere que el mero rojo presenta un sistema digestivo más adaptado a la digestión de carbohidratos, por el contrario, el robalo blanco posee un sistema digestivo menos adaptado a la digestión de estos nutrientes, catalogando al pargo canané en un nivel intermedio respecto a las dos especies.

Glucosa en plasma

En términos generales, la eficiencia de un organismo (vertebrados) para utilizar carbohidratos es definida por la velocidad en la que es capaz de incorporar glucosa a su torrente sanguíneo a partir de la digestión, así como de eliminarla del mismo (Polakof *et al.*, 2012). Las pruebas de tolerancia de glucosa en peces son una práctica común para evaluar su capacidad para utilizar glucosa. En mero rojo, después de una administración oral con 1.7 gramos de glucosa por kilogramo de peso húmedo, se observaron dos picos de glucosa en plasma de 5.6 (100.9 mg/dL) y 6.4 (115.3 mg/dL) mM/L, a las 2 y 12 horas respectivamente. Después de 24 horas los valores de glucosa en plasma retornaron a la concentración basal, 2.4 mM/L (43.2 mg/dL) (Castillo *et al.*, 2018b). El periodo de duración de la respuesta glicémica en el mero rojo fue similar a la reportada para *Sparus aurata* y *Dicentrarchus labrax*, después de una administración intraperitoneal de 1 gramo de glucosa por kilogramo de peso húmedo (Peres *et al.*, 1999). Lo anterior sugiere que la velocidad en la que el mero rojo metaboliza la glucosa es similar a la reportada en otros peces carnívoros.

En robalo blanco y pargo canané aún no se han reportado pruebas de tolerancia de glucosa, pero recientemente Arenas *et al.* (2021c) a través de un estudio comparativo reportaron la respuesta glicémica de estas especies después de consumir una dieta rica en carbohidratos, 20% (almidón de maíz). En robalo blanco el máximo pico en la concentración de glucosa en plasma fue de 8 mM/L (144.3 mg/dL) y se registró 6 horas después de consumir la dieta rica en carbohidratos, mientras que en pargo canané fue hasta las 9 horas con un valor de concentración de 14 mM/L (252.2 mg/dL). En ambas especies los valores de glucosa retornaron a concentraciones basales después de 12 horas. El comportamiento glucémico registrado en robalo blanco fue similar al reportado por Enes *et al.* (2011) en *D. labrax* alimentado con un porcentaje (20%) y fuente (almidón de maíz) similar de carbohidratos en el alimento. Lo anterior indica que el robalo blanco posee mecanismos de homeostasis de glucosa más eficiente que el pargo canané y similar al de otros peces carnívoros.

Metabolismo intermediario

En vertebrados, el hígado desempeña un papel central en la regulación de numerosos procesos del metabolismo intermediario en respuesta al estado nutricional (Walton & Cowey, 1982). Las enzimas hexoquinasas (I, II, III y VI) juegan un papel clave en la homeostasis de la glucosa en el hígado y en menor medida en otros tejidos, debido a que son responsables de catalizar la primera reacción de la vía de glucólisis (fosforilación de glucosa a glucosa-6 fosfato), ruta metabólica donde la glucosa es degradada. La hexoquinasa IV o glucocinasa (GK) es inducida por acción de la insulina y desempeña un papel central como sensor de glucosa en la regulación de la homeostasis de la glucosa después de consumir carbohidratos, mientras que las hexoquinasas (HK) I, II y II permiten que se lleve a cabo la fosforilación de la glucosa en condiciones de ayuno (Panserat *et al.*, 2014). La GK a diferencia del resto de isoformas, se caracteriza por su baja afinidad por la glucosa (K_m 10 mM) y por no ser inhibida por su producto (glucosa-6 fosfato) (Iynedjian, 2009). Durante mucho tiempo se creyó que la limitada habilidad de los peces para utilizar los carbohidratos se debía a una ausencia en la inducción de la enzima GK (Wilson, 1994). Sin embargo, a principios del siglo XXI se demostró que esta teoría era errónea y que la enzima GK si puede ser inducida por carbohidratos en peces (Caseras *et al.*, 2000; Panserat *et al.*, 2000). En algunos peces, particularmente carnívoros (p.ej. *Dentex dentex*, *D. labrax*, *Micropterus salmoides*, *Trachinotus ovatus*), aparentemente la inducción de la enzima GK es dependiente del nivel de carbohidratos en el alimento, se ha observado que porcentajes de inclusión $\geq 20\%$ generan una

inducible expresión bioquímica y expresión génica de esta enzima respecto a niveles de inclusión inferiores (Enes *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2018; Pérez-Jiménez *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015). Lo anterior sugiere que el efecto secretagogo de insulina por parte de los carbohidratos depende de la concentración en la que estos se encuentran en el alimento (Enes *et al.*, 2010).

La regulación nutricional de la enzima hepática GK por efecto de los carbohidratos ha sido utilizada como un indicador de la habilidad de los peces para metabolizar estos nutrientes (Panserat *et al.*, 2014). En este sentido, se ha evaluado la habilidad del robalo blanco, mero rojo y pargo canané para metabolizar carbohidratos. En mero rojo un nivel de inclusión de carbohidratos (almidón de maíz) en el alimento del 15% (almidón de maíz) respecto a 0%, no generó una respuesta bioquímica de la enzima hepática GK (Castillo *et al.*, 2018b), sin embargo, un nivel de inclusión de carbohidratos de 20% resultó en una inducible actividad bioquímica de esta enzima (Castillo *et al.*, 2018c), indicando que la inducción de la GK en ésta está en función del nivel de carbohidratos en el alimento. Similar al mero rojo, en robalo blanco se reportó que un nivel de inclusión de carbohidratos en el alimento del 20% (almidón de maíz) generó una inducción bioquímica y además génica de la enzima hepática GK, pero esto no en pargo canané (Arenas *et al.*, 2021c). La ausencia de inducción de la enzima GK en pargo canané sugieren un bajo efecto secretagogo de insulina por parte de los carbohidratos, lo cual además podría explicar la elevada hiperglucemia en esta especie después de consumir carbohidratos en comparación al robalo blanco y mero rojo.

La ruta de la pentosa fosfato y la glucogénesis son rutas metabólicas que contribuyen a mantener la homeostasis de la glucosa en estado postprandial a partir de la conversión de la glucosa a glucosa 6-fosfato, reacción que es catalizada por la enzima GK (Iynedjian, 2009). En la ruta de la pentosa fosfato se producen ribosas para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, también se genera NADPH, coenzima necesaria en el metabolismo anabólico, particularmente para la síntesis de ácidos grasos (lipogénesis) (Mayes & Bender, 2003). En la glucogénesis se sintetiza glucógeno, un polisacárido de reserva energética formado por cadenas de glucosa. En peces carnívoros, la ruta de la pentosa fosfato es más eficaz en el control de la glucemia postprandial que la glucogénesis, en otras palabras, los peces carnívoros presentan mayor eficiencia en convertir la glucosa dietética en lípidos que en glucógeno (Panserat *et al.*, 2009). En robalo blanco, mero rojo y pargo canané, se ha reportado una dependencia positiva de las enzimas hepáticas claves de la ruta de la ruta pentosa fosfato (p. ej. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, G6PDH; 6-fosfoluconato deshidrogenasa,

6PGDH) y glucogénesis (glucógeno) hacia la activación de la enzima hepática GK (Arenas *et al.* 2021c; Castillo *et al.* 2018b y 2018c).

En peces carnívoros como *D. labrax* (Enes *et al.*, 2006), *E. coioides* (H. Liu *et al.*, 2020) y *Oncorhynchus mykiss* (Panserat *et al.*, 2009), se ha reportado que a pesar de presentar una rápida adaptación a la presencia de carbohidratos en el alimento por incremento del potencial de las enzimas claves involucradas en la ruta de glucólisis (p.ej. fosfofructoquinasa-1, PFK-1; piruvato quinasa, PK), exhiben una alta y persistente actividad de las enzimas claves involucradas en la vía de gluconeogénesis (p.ej. Fructosa-1,6-bisfosfatas, FBPasa; glucosa-6-fosfatasa, G6Pasa; fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, PEPCCK), lo anterior indica una baja capacidad de estas especies para regular la síntesis de glucosa en presencia de glucosa dietética. En contraste, una reducción en la actividad de FBPasa y un incremento en la actividad de PK en hígado fue reportada en robalo blanco, mero rojo y pargo canané después de ser alimentados con carbohidratos (Arenas *et al.* 2021c; Castillo *et al.* 2018b y 2018c), indicando que los mecanismos implicados en el control de la gluconeogénesis en estas especies son sensibles a la fosforilación de la glucosa dietética.

En peces, se asume que los aminoácidos son los principales sustratos utilizados en la gluconeogénesis (Cowey, 1995; Jia *et al.*, 2017). Los cambios del potencial bioquímico o génico de las enzimas claves involucradas en el catabolismo de aminoácidos (p. ej. Alanina aminotransferasa, ALT; aspartato aminotransferasa, ASAT; glutamato deshidrogenasa, GDH) y gluconeogénesis en nutrición de peces son utilizados para enfatizar el rol de las proteínas y lípidos como sustratos gluconeogénicos (Cowey *et al.*, 1981). En los estudios de nutrición de carbohidratos en robalo blanco y pargo canané han sido evaluadas, los resultados reportados muestran que a pesar de que el potencial de gluconeogénesis (actividad bioquímica de FBPasa) decreció cuando los peces fueron alimentados con carbohidratos (20%, almidón de maíz), el catabolismo de aminoácidos (actividad bioquímica de ALT) permaneció constante (Arenas *et al.*, 2021c). Lo anterior sugiere que un sustrato de la gluconeogénesis alterno a los aminoácidos es deprimido metabólicamente en presencia de glucosa dietética en ambas especies de peces, glicerol (lípidos). Efecto de ahorro de proteína por carbohidratos.

El ahorro de proteína es el proceso por el cual los peces obtienen energía de nutrientes distintos a las proteínas, tales como lípidos y carbohidratos (NRC, 2011). El efecto de ahorro de proteína en peces es sencillo de identificar a través de indicadores de crecimiento o de eficiencia alimenticia. El incremento en la tasa de crecimiento y eficiencia alimenticia generalmente se encuentra asociado

a una mayor canalización de proteínas a la producción de tejido que en energía, dado que la energía es obtenida por un nutriente alternativo (Arenas *et al.*, 2021a; Arenas *et al.*, 2021b). La inclusión de carbohidratos digeribles en el alimento (20%, almidón de maíz) en robalo blanco mejoró la eficiencia alimenticia (p.ej. Factor de conversión alimenticia, FCA; tasa de eficiencia proteica, TEP) versus un alimento sin carbohidratos digeribles (0%) (Arenas *et al.*, 2021c). En mero rojo y pargo canané la presencia de carbohidratos en el alimento, 20 y 15% (almidón de maíz), respectivamente, no generó un efecto de ahorro de proteína en ambas especies de peces (Arenas *et al.*, 2021c; Castillo *et al.*, 2018b). Estos resultados indican que el robalo blanco presenta una mayor habilidad para utilizar carbohidratos como sustratos energéticos que el mero rojo y pargo canané. Complejidad molecular de los carbohidratos.

Las de fuentes de carbohidratos de alta complejidad molecular (p. ej. Dextrinas y almidones) suelen utilizarse más en la formulación de alimentos para peces carnívoros que las de baja complejidad molecular (p. ej. Glucosa y maltosa). Los carbohidratos de baja complejidad molecular provocan elevadas y prolongadas condiciones de glucemia en los peces después de consumirlos (Deng *et al.*, 2001). Por otra parte, en algunos peces carnívoros se ha reportado una baja eficiencia en el aprovechamiento de carbohidratos de baja complejidad molecular, lo cual es atribuido a una rápida absorción y eliminación antes de poder ser metabolizados por estos (Cui *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2003). La absorción de carbohidratos complejos como los almidones es lenta, debido a que tienen que ser digeridos antes de poder ser absorbidos y metabolizados. Sin embargo, el grado de polimerización y tamaño de partícula en los almidones es un factor determinante para su aprovechamiento por los peces (Liu *et al.*, 2014; Peres & Oliva-Teles, 2002).

Los almidones están compuestos por dos moléculas, amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula lineal que se encuentran unidas por enlaces glucosídicos α 1-4, mientras que la amilopectina es una molécula ramificada unida por enlaces glucosídicos α 1-4 y α 1-6. Castillo *et al.* (2018c) reportaron un mejor crecimiento en mero rojo cuando fue alimentado con almidón de maíz waxi (99% amilopectina) comparado con almidón de maíz nativo crudo (73% amilopectina), almidón de papa crudo (78% amilopectina) y almidón de papa pregelatinizado (78% amilopectina). La eficiencia en la utilización del almidón de maíz wax fue atribuido a su menor tamaño de partícula en comparación del resto de almidones, sin embargo, una mayor superficie de hidrólisis por la enzima α glucosidasa sobre los enlaces glucosídicos α 1-6 no puede ser descartada (mayor disponibilidad de glucosa).

7. Conclusiones

El robalo blanco, mero rojo y pargo canané presentan diferentes mecanismos fisiológicos de adaptación a la presencia de carbohidratos en el alimento. Naturalmente, el mero rojo presenta mayor potencial digestivo de la enzima α amilasa que el pargo canané, este último al robalo blanco. En contraste con el mero rojo, el robalo blanco y pargo canané son capaces de adaptarse digestivamente a la presencia de carbohidratos en el alimento por un incremento en el potencial digestivo de α -amilasa. Sin embargo, la baja habilidad del pargo canané para mantener la homeostasis de la glucosa en estado postprandial, así como la ausencia de un efecto de ahorro de proteína por carbohidratos en esta especie y mero rojo, el potencial digestivo no debe ser considerado como un estimador de la habilidad de los peces para metabolizar o utilizar carbohidratos.

Por otra parte, a pesar de que las tres especies de peces son capaces de adaptarse metabólicamente a la presencia de carbohidratos en el alimento por incremento del potencial de glucólisis y reducción del potencial de gluconeogénesis, pero el aprovechamiento nutricional de los carbohidratos entre especies se encuentra estrechamente relacionado con la activación de la enzima GK, aparentemente el almacenamiento de este nutriente por glucogénesis y la vía de la pentosa fosfato es un factor determinante en su aprovechamiento como sustratos energéticos, principalmente en esta última.

8. Bibliografía

- Ahumada-Hernández, R. I., Alvarez-González, C. A., Guerrero-Zárate, R., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., Sánchez-Zamora, A., Gaxiola-Cortés, M. G., Palomino-Albarrán, I. G., Tovar-Ramírez, D., & Gisbert, E. (2014). Changes of digestive enzymatic activity on yellowtail snapper (*Ocyurus chrysurus*) during initial ontogeny. *International Journal of Biology*, 6(4), 110–118. <https://doi.org/10.5539/ijb.v6n4p110>
- Arenas, M., Álvarez-González, A., Barreto, Á., Sánchez, A., Cuzon, G., & Gaxiola, G. (2021). Evaluation of protein: lipid ratio on growth, feed efficiency, and metabolic response in juvenile yellowtail snapper *Ocyurus chrysurus* (Bloch, 1791). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(2), 329–341. <https://doi.org/10.3856/vol49-issue2-fulltext-2660>
- Arenas, M., Álvarez-González, A., Barreto, A., Sánchez, A., Suárez-Bautista, J., Escalante, K., & Gaxiola, G. (2021). Effect of dietary carbohydrates on growth performance, feed efficiency and glucose metabolism in common snook (*Centropomus undecimalis*) and yellowtail snapper (*Ocyurus chrysurus*) juveniles. *Aquaculture*, 543(May), 736958. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736958>
- Arenas, M., Álvarez-González, C. A., Barreto, A., Sánchez-Zamora, A., Suárez-Bautista, J., Cuzon, G., & Gaxiola, G. (2021). Physiological and metabolic protein-sparing effects of dietary lipids on common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, July 2020, 1–14. <https://doi.org/10.1111/anu.13250>
- Arreguín-Sánchez, F., & Arcos-Huitrón, E. (2011). La pesca en México: estado de la explotación y uso de los ecosistemas. *Hidrobiológica*, 21(3), 431–462. www.ecopath.org
- Barreto-Altamirano, A. F. (2016). Evaluación de la digestibilidad in vitro y aparente en distintas fuentes de proteína en juveniles de pargo canané (*Ocyurus chrysurus*). Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Blewett, D. A., Hensley, R. A., & Stevens, P. W. (2006). Feeding habits of common snook, *Centropomus undecimalis*, in Charlotte Harbor, Florida. *Gulf and Caribbean Research*, 18, 1–13. <https://doi.org/10.18785/gcr.1801.01>
- Boonanuntanasarn, S., Kumkhong, S., Yoohat, K., Plagnes-Juan, E., Burel, C., Marandel, L., & Panserat, S. (2018). Molecular responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to different levels of dietary carbohydrates. *Aquaculture*, 482(September 2017), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.032>
- Brulé, T., & Canché, L. G. R. (1992). Food habits of juveniles red groupers, *Epinephelus morio* (Valenciennes, 1828), from Campeche bank, Yucatan, Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 52(2), 772–779.
- Brulé, T., Noh-Quñones, V. E., Sánchez-Crespo, M., Colás-Marrufo, T., & Pérez-Díaz, E. (2008). Composición de las capturas comerciales del complejo mero-pargo en el sureste del Golfo de México e implicaciones para el manejo de su pesquería comercial. *Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 61, 198–209.
- Buddington, R. K., Chen, J. W., & Diamond, J. (1987). Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. *The Journal of Physiology*, 393(1), 261–281. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016823>
- Caballero-Chávez, V. (2012). Evaluación de la pesquería de robalo blanco *Centropomus undecimalis* en Ciudad del Carmen, Campeche. *Ciencia Pesquera*, 20(2), 35–42.

- Carvalho-Filho, A., de Oliveira, J., Soares, C., & Araripe, J. (2019). A new species of snook, *Centropomus* (Teleostei: Centropomidae), from northern South America, with notes on the geographic distribution of other species of the genus. *Zootaxa*, 4671(1), 81–92. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4671.1.6>
- Caseras, A., Metó, I., Fernández, F., & Baanante, I. v. (2000). Glucokinase gene expression is regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1493, 135–141. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00173-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00173-1)
- Castillo, A., Alvarez, A., Cuzon, G., Suárez, J., & Gaxiola, G. (2018). Glycemic response after glucose oral administration of wild juvenile red grouper *Epinephelus morio* fed two different diets. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(1), 219–226. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0426-4>
- Castillo, A., Callejas, L., Álvarez-González, C. A., Maldonado, C., Cuzon, G., & Gaxiola-Cortés, M. G. (2018). Effect of native and modified starches on nutritional and physiological performance of wild juveniles of red grouper (*Epinephelus morio*). *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5(15), 491–500. <https://doi.org/10.19136/era.a5n15.1548>
- Concha-Frías, B., Álvarez-González, C. A., Gaxiola, G., Chiappa, X., Martínez-garcía, R., Camarillo-Coop, S., Peña, E. D. L., & Cruz-Alvarado, F. J. (2018). Dietary protein requirement in common snook (*Centropomus undecimalis*) juveniles reared in marine and brackish water. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5(13), 45–54. <https://doi.org/10.19136/era.a5n13.1393>
- Cowey, C. B. (1995). Protein and amino acid requirements: A critique of methods. *Journal of Applied Ichthyology*, 11(3–4), 199–204.
- Cowey, C. B., Cooke, D. J., Matty, A. J., & Adron, J. W. (1981). Effects of quantity and quality of dietary protein on certain enzyme activities in rainbow trout. *The Journal of Nutrition*, 111(2), 336–345. <https://doi.org/10.1093/jn/111.2.336>
- Cowey, C. B., & Walton, M. J. (1988). Studies on the uptake of (14C) amino acids derived from both dietary (14C) protein and dietary (14C) amino acids by rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 33(2), 293–305.
- Cui, X. J., Zhou, Q. C., Liang, H. O., Yang, J., & Zhao, L. M. (2010). Effects of dietary carbohydrate sources on the growth performance and hepatic carbohydrate metabolic enzyme activities of juvenile cobia (*Rachycentron canadum* Linnaeus.). *Aquaculture Research*, 42, 99–107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02574.x>
- Cummings, N. J. (2004). The biology of yellowtail, *Ocyurus chrysurus*, with emphasis on populations in the Caribbean. Sustainable Fisheries Division Contribution (SFD), 196.
- de La Morinière, E. C., Pollux, B. J. A., Nagelkerken, I., & van der Velde, G. (2002). Post-settlement life cycle migration patterns and habitat preference of coral reef fish that use seagrass and mangrove habitats as nurseries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55(2), 309–321. <https://doi.org/10.1006/ecss.2001.0907>
- Deng, D. F., Refstie, S., & Hung, S. S. O. (2001). Glycemic and glycosuric responses in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) after oral administration of simple and complex carbohydrates. *Aquaculture*, 199, 107–117.
- Echazabal-Salazar, O., Morales-Bojórquez, E., & Arreguín-Sánchez, F. (2021). Biomass dynamic model for multiple data series: An improved approach for the management of the red grouper (*Epinephelus morio*) fishery of the

- Campeche Bank, Mexico. *Regional Studies in Marine Science*, 47, 101962. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101962>
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., & Oliva-Teles, A. (2006). Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 143(1), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.10.027>
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., & Oliva-Teles, A. (2008). Growth performance and metabolic utilization of diets with native and waxy maize starch by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 274, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.009>
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., & Oliva-Teles, A. (2009). Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(3), 519–539. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9259-5>
- Enes, P., Peres, H., Almeida, I., Couto, A., & Oliva-Teles, A. (2011). Growth, feed utilization, and glycemic response in European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, juveniles fed carbohydrate of different complexities. *Journal of World Aquaculture Society*, 42, 873–879. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00525.x>
- Enes, P., Sanchez-Gurmaches, J., Navarro, I., Gutiérrez, J., & Oliva-Teles, A. (2010). Role of insulin and IGF-I on the regulation of glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed with different dietary carbohydrate levels. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 157(4), 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.08.006>
- Enriquez, R. M. L. (2018). Requerimiento de proteína de juveniles de pargo canané (*Ocyurus chrysurus*), utilizando harina de ave y pasta de canola como sustitutos parciales de la proteína de pescado. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fernández, I., Moyano, F. J., Díaz, M., & Martínez, T. (2001). Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 262(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00228-3](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00228-3)
- Furuichi, M., & Yone, Y. (1981). Change of blood Sugar and Plasma in Glucose Tolerance Insulin Levels Test*1. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 47(6), 761–764.
- Gilmore, R. G., Billock, L. H., & Berry, F. H. (1978). Hypothermal mortality in marine fishes of south-central Florida January, 1977. *Northeast Gulf Science*, 2(2), 77–97.
- Giménez-Hurtado, E., Coyula-Pérez-Puelles, R., Lluch-Cota, S. E., González-Yañez, A. A., Moreno-García, V., & Burgos-De-La-Rosa, R. (2005). Historical biomass, fishing mortality, and recruitment trends of the Campeche Bank red grouper (*Epinephelus morio*). *Fisheries Research*, 71(3), 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2004.09.001>
- Gracia-López, V., García-Galano, T., Gaxiola-Córtés, G., & Pacheco-Campos, J. (2003). Effect of dietary protein level and commercial feeds on growth and feeding of juvenile common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). *Ciencias Marinas*, 29(4B), 585–594. <https://doi.org/10.7773/cm.v29i42.198>

- Harpaz, S., & Uni, Z. (1999). Activity of intestinal mucosal brush border membrane enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 124(2), 155–160. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00106-3](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00106-3)
- Hidalgo, M. C., Urea, E., & Sanz, A. (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170, 267–283. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(98\)00413-x](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00413-x)
- Hua, K., Cobcroft, J. M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D. R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M. J., Zeng, C., Zenger, K., & Strugnell, J. M. (2019). The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets. In *One Earth* (Vol. 1, Issue 3, pp. 316–329). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.018>
- Iynedjian, P. B. (2009). Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(1), 27–42. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8322-9>
- Jia, S., Li, X., Zheng, S., & Wu, G. (2017). Amino acids are major energy substrates for tissues of hybrid striped bass and zebrafish. *Amino Acids*, 49(12), 2053–2063. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2481-7>
- Jimenez-Martinez, L. D., Alvarez-González, C. A., Tovar-Ramírez, D., Gaxiola, G., Sanchez-Zamora, A., Moyano, F. J., Alarcón, F. J., Márquez-Couturier, G., Gisbert, E., Contreras-Sánchez, W. M., Perales-García, N., Arias-Rodríguez, L., Indy, J. R., Páramo-Delgadillo, S., & Palomino-Albarrán, I. G. (2012). Digestive enzyme activities during early ontogeny in common snook (*Centropomus undecimalis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(2), 441–454. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9525-9>
- Kamalam, B. S., Medale, F., & Panserat, S. (2017). Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture*, 467, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.007>
- Krogdahl, A., Hemre, G. I., & Mommsen, T. P. (2005). Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition*, 11, 103–122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x>
- Kuz'mina, V. v, Golovanova, I. L., & Izvekova, G. I. (1996). Influence of Temperature and Season On Some Characteristics of Intestinal Mucosa Carbohydrases in Six Freshwater Fishes. *Biochem. Physiol*, 113(2), 255–260.
- Lee, S. M., Kim, K. D., & Lall, S. P. (2003). Utilization of glucose, maltose, dextrin and cellulose by juvenile flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 221, 427–438. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00061-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00061-9)
- Lemus, I., Maldonado, C., Cuzon, G., Sanchez, A., Gaxiola, G., Alvarez, A., & Guerrero, M. (2018). In Vitro and In Vivo Feedstuff Digestibility for Snook, *Centropomus undecimalis*, Juveniles. *Journal of the World Aquaculture Society*, 49(1), 205–215. <https://doi.org/10.1111/jwas.12429>
- Lin, S. M., Shi, C. M., Mu, M. M., Chen, Y. J., & Luo, L. (2018). Effect of high dietary starch levels on growth, hepatic glucose metabolism, oxidative status and immune response of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 78, 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.046>
- Lindeman, K., Anderson, W., Carpenter, K. E., Claro, R., Cowan, J., Padovani-Ferreira, B., Rocha, L. A., Sedberry, G., & Zapp-Sluis, M. (2016). *Ocyurus chrysurus*, yellowtail snapper. In *The IUCN Red List of Threatened Species*.

- Liu, H., Yang, J. J., Dong, X. H., Tan, B. P., Zhang, S., Chi, S. Y., Yang, Qi. H., Liu, H. Y., & Yang, Y. Z. (2020). Effects of different dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, plasma biochemical indexes, digestive, and immune enzymes activities of sub-adult orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00799-4>
- Liu, X. he, Ye, C. xia, Ye, J. dan, Shen, B. duan, Wang, C. yan, & Wang, A. li. (2014). Effects of dietary amylose/amylopectin ratio on growth performance, feed utilization, digestive enzymes, and postprandial metabolic responses in juvenile obscure puffer *Takifugu obscurus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(5), 1423–1436. <https://doi.org/10.1007/s10695-014-9937-4>
- Mayes, P. A., & Bender, D. A. (2003). The pentose phosphate pathway & other ptahways of hexose metabolism. In R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, & V. W. Rodwell (Eds.), *Harper's illustrated biochemistry* (6th ed., p. 702). Lange Medical Books/McGraw-Hil.
- McMichael, R. H., Peters, G. R., & Parsons, G. R. (1989). Early life history of the snook *Centropomus*, in Tampa Bay, Florida. *Northeast Gulf Science*, 10(2), 113–125.
- Moe, M. (1969). Biology of the red grouper *Epinephelus morio* (Valenciennes) from the eastern Gulf of Mexico. <https://www.researchgate.net/publication/34157325>
- Mommsen, T., & Plisetskaya, E., (1991). Insulin in fishes and agnathans: history, structure, and metabolic regulation. *Reviews in Aquatic Science*, 4, 225–259
- Nagelkerken, I., & van der Velde, G. (2004). Are Caribbean mangroves important feeding grounds for juvenile reef fish from adjacent seagrass beds?. *Marine Ecology Progress Series*, 274, 143–151.
- Navarro, I., Leibush, B., Moon, T. W., Plisetskaya, E. M., Baños, N., Méndez, E., Planas, J. v., & Gutiérrez, J. (1999). Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and glucagon: The evolution of their receptors. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*, 122(2), 137–153. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)10163-3](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10163-3)
- Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the world* (4th ed.). y John Wiley & Sons, Inc.
- NRC. (2011). *Nutrient Riqueriments of Fish and Shrimp*. In The National Academies Press.
- Oliva-Teles, A., Couto, A., Enes, P., & Peres, H. (2020). Dietary protein requirements of fish – a meta-analysis. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1445–1477. <https://doi.org/10.1111/raq.12391>
- Panserat, S., Capilla, E., Gutierrez, J., Frappart, P. O., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Aguirre, P., Brèque, J., & Kaushik, S. (2001). Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 128(2), 275–283. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(00\)00322-5](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(00)00322-5)
- Panserat, S., Médale, F., Blin, C., Brèque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R., & Kaushik, S. (2000). Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278, R1164–R1170. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.278.5.R1164>
- Panserat, S., Rideau, N., & Polakof, S. (2014). Nutritional regulation of glucokinase: a cross-species story. *Nutrition Research Reviews*, 27, 21–47. <https://doi.org/10.1017/S0954422414000018>

- Panserat, S., Skiba-Cassy, S., Seiliez, I., Lansard, M., Plagnes-Juan, E., Vachot, C., Aguirre, P., Larroquet, L., Chavernac, G., Medale, F., Corraze, G., Kaushik, S., & Moon, T. W. (2009). Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: a link with the induction of hepatic lipogenic capacities?. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 297(3), 707–715. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00120.2009>
- Párrizas, M., Planas, J., Plisetskaya, E. M., & Gutiérrez, J. (1994). Insulin binding and receptor tyrosine kinase activity in skeletal muscle of carnivorous and omnivorous fish. *American Journal of Physiology*, 266, R1944 – R1950. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.266.6.r1944>
- Peres, H., Gonçalves, P., & Oliva-Teles, A. (1999). Glucose tolerance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 179, 415–423. 10.1016/S0044-8486(99)00175-1
- Peres, H., & Oliva-Teles, A. (2002). Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 205(3–4), 287–299.
- Pérez-Jiménez, A., Abellán, E., Arizcun, M., Cardenete, G., Morales, A. E., & Hidalgo, M. C. (2015). Nutritional and metabolic responses in common dentex (*Dentex dentex*) fed on different types and levels of carbohydrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 184, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.02.002>
- Perez-Pinzón, M. A., & Lutz, P. L. (1991). Activity related cost of osmoregulation in the juvenile snook (*Centropomus undecimalis*). *Bulletin of Marine Science*, 48(1), 58–66.
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J. L., & Moon, T. W. (2012). Glucose metabolism in fish: A review. *Journal of Comparative Physiology B*, 182, 1015–1045. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0658-7>
- Ren, M., Habte-Tsion, H. M., Xie, J., Liu, B., Zhou, Q., Ge, X., Pan, L., & Chen, R. (2015). Effects of dietary carbohydrate source on growth performance, diet digestibility and liver glucose enzyme activity in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture*, 438, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.008>
- Rivas, L. R. (1986). Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia*, 3, 579–611. <https://doi.org/10.2307/1444940>
- SAGARPA. (2007). Modificación a la norma oficial mexicana NOM-017-PESC-1994, para regular las actividades de pesca deportivo-recreativa en las aguas de jurisdicción federal de los Estados Unidos Mexicanos, publicada el 9 de mayo de 1995. *Diario Oficial de La Federación*, 1, 59–101.
- SAGARPA. (2017). Carta Nacional Pesquera. *Diario Oficial de La Federación*.
- Silva, A. F. D. (2017). Requerimiento de proteína y energía: Efecto en el banace bioenergético en juveniles silvestres del mero rojo *Epinephelus morio* (Valenciennes 1828). Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Silva, A. F., Escalante, K., Alvarez-González, A., Guerrero-Olazarán, M., Cuzon, G., & Gaxiola, G. (2014). Testing protein digestibility in red grouper *Epinephelus morio* using in vitro and in vivo methods. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 1–10. <http://www.siamb.org.il>

- Silvão, C. F., & Nunes, A. J. P. (2017). Effect of dietary amino acid composition from proteins alternative to fishmeal on the growth of juveniles of the common snook, *Centropomus undecimalis*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(7), 569–575. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902017000700003>
- Stone, D. A. J. (2003). Dietary carbohydrate utilization by fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11(4), 337–369. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90363-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90363-8)
- Taylor, R. G., Grier, H. J., & Whittington, J. A. (1998). Spawning rhythms of common snook in Florida. *Journal of Fish Biology*, 53, 502–520.
- Tucker, JR. J. W. (1987). Snook and tarpon snook culture and preliminary evaluation for commercial farming. *The Progressive Fish-Culturist*, 49, 49–57. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1987\)49<49:SATSCA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1987)49<49:SATSCA>2.0.CO;2)
- Van Waarde, A. (1983). Review aerobic and anaerobic ammonia production by fish. *Comparative Biochemical and Physiology*, 74(4), 675–684.
- Verweij, M. C., Nagelkerken, I., Hans, I., Ruseler, S. M., & Mason, P. R. D. (2008). Seagrass nurseries contribute to coral reef fish populations. *Limnology and Oceanography*, 53(4), 1540–1547.
- Walton, M. J., & Cowey, C. B. (1982). Aspect of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 73B(1), 59–79. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(75\)90235-X](https://doi.org/10.1016/0016-6480(75)90235-X)
- West, T. G., Arthur, P. G., Suarez, R. K., Doll, C. J., & Hochachka, P. W. (1993). In vivo utilization of glucose by heart and locomotory muscles of exercising rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 177(1), 63–79.
- Wilson, R. P. (1994). Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*, 124(1–4), 67–80. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90363-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90363-8)
- Zhou, C., Ge, X., Niu, J., Lin, H., Huang, Z., & Tan, X. (2015). Effect of dietary carbohydrate levels on growth performance, body composition, intestinal and hepatic enzyme activities, and growth hormone gene expression of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. In *Aquaculture* (Vol. 437). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.016>

Avances en Nutrición del Langostino *Macrobrachium acanthurus*

Susana Alejandra Frías Gómez^{1,3}, Madison S. Powell² & Luis Héctor Hernández Hernández³

¹ Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, Ciudad de México, México

² Aquaculture Research Institute, University of Idaho, Hagerman, Idaho, USA

³ Laboratorio de Producción Acuícola, UNAM FES Iztacala, Tlalnepantla, México

Autor de correspondencia: Luis Héctor Hernández Hernández, Tel. 52 55 5623 1197

e-mail: luish3@yahoo.com

Resumen

El langostino *Macrobrachium acanthurus* es una especie con el potencial para ser cultivado y en el Laboratorio de Producción Acuícola de la UNAM FES Iztacala se ha trabajado en la determinación de los requerimientos nutricionales en diferentes estadios de desarrollo de esta especie. Por ello, a continuación, presentamos algunos de los avances que hemos obtenido en los requerimientos de proteína, lípidos y carbohidratos en postlarvas, de vitaminas en las larvas, así como el uso de algunos aditivos en juveniles. Se ha logrado establecer la combinación de inclusión de 35% proteína, 15-120% lípidos y un máximo de 15% de carbohidratos. La inclusión de las vitaminas A y C permiten aumentar el porcentaje de supervivencia durante la etapa larvaria, mientras que el uso de prebióticos (fructooligosacáridos y mananoligosacáridos) podrían tener un efecto positivo en la maduración sexual de hembras.

Palabras clave: *langostinos, requerimientos nutricionales y cultivo*

1. Introducción

El langostino *Macrobrachium acanthurus* (Palaemonidae:Crustacea) es endémico de América y se distribuye en ríos, lagunas y zonas estuarinas (Albertoni *et al.*, 2002; Tamborus *et al.*, 2012) a lo largo de la costa del Atlántico, desde Carolina del Norte en Estados Unidos y hasta Rio Grande do Sul, Brasil (García-Guerrero *et al.*, 2013). Esta especie se caracteriza por tener una longitud de 108 a 138 mm, un rostro casi recto con margen superior que posee de 8 a 12 dientes y en el margen inferior, de 4 a 7. Sin embargo, la característica morfológica más distintiva de esta especie es el segundo par de pereópodos, los cuales son muy largos, particularmente en los machos (Figura 1). De acuerdo con Albertoni *et al.* (2003), los juveniles y adultos de *M. acanthurus* se alimentan de principalmente de detritus, seguido de macroalgas y larvas de insectos acuáticos.



Figura 1. Ejemplares macho (a) y hembra (b) de *Macrobrachium acanthurus*. Los organismos fueron colectados en el río Coatzacoalcos, Veracruz.

En México esta especie representa una importante fuente de recursos para los pescadores de los estados de Veracruz y Tabasco (Hernández-Abad *et al.*, 2018). Particularmente en el estado de Veracruz se ha observado un descenso en las capturas desde 1996, aspecto que indica la disminución de las poblaciones naturales. Aunque es un fenómeno multi- factorial, Loran-Núñez (2017) señala que la sobrepesca, la contaminación de ríos como el Papaloapan, Coxcoapan, Actopan, Coatzacoalcos y sus tributarios, son las causas principales de la paulatina desaparición de esta y otras especies de langostinos. Sin duda, esto afecta a los pescadores que al ver sus capturas disminuidas optan por capturar otras especies o modificar su estilo de vida, haciendo su vida más precaria. Sin duda, el cultivo de esta especie ayudaría a disminuir las pesquerías y permitiría que las poblaciones naturales se recuperaran, además de proveer empleo a los pescadores. De acuerdo

con Kutty & Valenti (2010), el interés en desarrollar el cultivo de esta especie se ha mantenido latente por varios años en diversos países, pero debido a la dificultad del cultivo larvario, no se ha avanzado en ello. Recientemente en Brasil se reportó la posibilidad de cultivarla en conjunto con el pacu curimatã *Prochilodus argenteus* (De Almeida *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2019).

Así mismo, durante los últimos 10 años en el Laboratorio de Producción Acuícola de la UNAM FES Iztacala se ha trabajado en el cultivo de esta especie, particularmente en la determinación de los requerimientos nutricionales de los diferentes estadios del ciclo de vida. Por ello, la presente revisión tiene como objetivo presentar los avances que se han obtenido en el laboratorio y que han permitido avanzar en el desarrollo de alimentos balanceados para su cultivo.

2. Requerimientos de proteínas, lípidos y carbohidratos

En la Tabla 1, se muestran los requerimientos de macronutrientes para el langostino *M. acanthurus* hasta ahora determinados. El requerimiento de proteína para juveniles fue reportado por Villafuerte *et al.* (2016) y determinado mediante el modelo de línea de rompimiento utilizando la ganancia en peso (%) como variable de respuesta. De acuerdo con el modelo el requerimiento mínimo fue de 37.8%, el cual es similar al reportado para otras especies de crustáceos comerciales como el langostino malayo *M. rosenbergii* (Teshima *et al.*, 2006) y el camarón tigre *Penaeus monodon* (Chen 1993).

Respecto a requerimientos de lípidos, Hernández-Abad *et al.* (2018) reportaron que inclusiones de 15 a 17.5% tienen un efecto positivo sobre la maduración sexual y la producción de huevo en hembras. Este rango de inclusión causó un aumento en el número de huevos producidos por cada hembra, así como un aumento en el contenido de proteína y lípidos en los huevos.

Tabla 1. Requerimientos de proteína, lípidos y carbohidratos reportados para diferentes estadios de desarrollo del langostino *Macrobrachium acanthurus*.

Estadio de desarrollo (peso inicial en g)	Nutriente	Requerimiento estimado (%)	Variable de respuesta	Referencia
Juvenil (3)	Proteína	37.8	Ganancia en peso (%)	Villafuerte <i>et al.</i> (2016)
Hembras (0.4)	Lípidos	15-17.5	Maduración sexual Producción de huevos	Hernández-Abad <i>et al.</i> (2018)
Postlarvas (0.06)	Proteína	35	Crecimiento	Frías (2020)
	Lípidos	15-20	Excreción de	
	Carbohidratos	15	nitrógeno	

Considerando esta información y reportes previos (Albertoni *et al.*, 2002; Kutty & Valenti 2010) sobre la posibilidad de utilizar alimentos balanceados con un nivel bajo de proteína debido a los hábitos alimenticios de *M. acanthurus*, Frías (2020) reportó el uso de 12 diferentes alimentos que consideraron tres niveles de proteína (30, 35 y 40%) y en cada uno de ellos, se incluyeron lípidos en concentraciones cada vez más bajas conforme aumentó la inclusión de carbohidratos y tomando como límite un nivel de 400 kcal/100g de alimento. Los alimentos se dieron a postlarvas por un periodo de 60 días, determinando el crecimiento y la excreción de nitrógeno amoniacal. Se observó un mejor crecimiento en términos de la ganancia en peso (%), Figura 2a) y de la tasa de crecimiento específico (%/día, Figura 2b) en las postlarvas alimentadas con la inclusión de 35% de proteína, pero particularmente en aquellas alimentadas con 15% de lípidos y 15% de carbohidratos. Es importante señalar que independientemente del nivel de proteína, los alimentos con inclusiones altas de carbohidratos causaron un menor crecimiento en las postlarvas. Esto indica que un nivel por debajo de 35% no es adecuado para el crecimiento de los juveniles, además de que los carbohidratos no son una fuente energética para esta especie, especialmente cuando hay una ingesta baja de proteína.

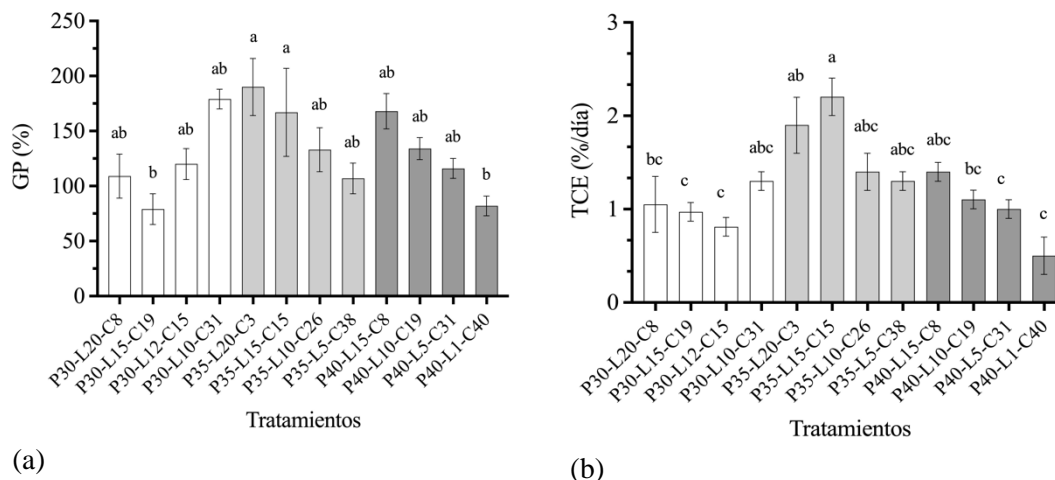


Figura 2. Parámetros de crecimiento en ganancia en peso (a) y tasa de crecimiento específico (b) de postlarvas de *M. acanthurus* alimentadas con diferentes niveles de proteína, lípidos y carbohidratos por un periodo de 60 días. Cada barra representa la media de tres repeticiones \pm el error estándar. Letras diferentes entre las columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En cuanto a los requerimientos de aminoácidos, Hernández *et al.* (2015) reportaron que enriquecieron nauplios de *Artemia* con 2 concentraciones de DL-metionina (40 y 60 mg/ml) y se utilizaron para alimentar a larvas desde la primera alimentación y hasta que alcanzaron el estadio de postlarva. Sus resultados muestran que hubo una mejor supervivencia de las larvas alimentadas con la concentración de 40 mg/ml.

3. Vitaminas

La información respecto a los requerimientos de vitaminas se ha estudiado principalmente en el estadio larvario, pues la inclusión de estos compuestos ayuda al desarrollo y supervivencia de los organismos durante el estadio larvario (Hernández & Hardy 2020).

Hernández *et al.* (2015) reportaron que el enriquecimiento de nauplios de *Artemia* con 40 mg/ml de vitamina C (incluido como 2-fosfo-L ácido ascórbico trisodio) tuvo un efecto positivo sobre la supervivencia de larvas, ya que mostraron un porcentaje de 20% y el grupo control sin enriquecimiento, el 10% en 33 días, tiempo en que alcanzaron el estadio de postlarva.

Por otro lado, Castillo (2021) reportó que la inclusión de vitamina A mejora la supervivencia de las larvas. La vitamina A (incluida como palmitato de retinol) se agregó en concentraciones de 0, 5, 10 y 20 mg en microcápsulas elaboradas con grenetina, goma arábiga y ácido oleico. Las

microcápsulas se adicionaron a los nauplios por un periodo de 30 minutos y posteriormente fueron agregadas a las arcas del langostino. Los resultados muestran que la concentración de 10 mg tuvo un efecto significativo en la supervivencia (40%), seguido de la concentración de 5 mg (30%). El grupo control (0 mg) tuvo una supervivencia del 18.3%, mientras que el grupo alimentado con 20 mg solo tuvo 1.7% de supervivencia (Figura 3). Así mismo, los organismos alimentados con 10 mg de vitamina A tuvieron un desarrollo más rápido, es decir, los organismos alimentados con esta concentración alcanzaron más rápidamente el estadio de postlarva que los organismos alimentados con las otras concentraciones. Los resultados obtenidos indican que la vitamina A es esencial para el desarrollo larvario de *M. acanthurus* y el nivel más adecuado fue de 10 mg. Como se ha reportado en otros organismos acuáticos (Hernández & Hardy 2020), el exceso de esta vitamina puede afectar el desarrollo normal.

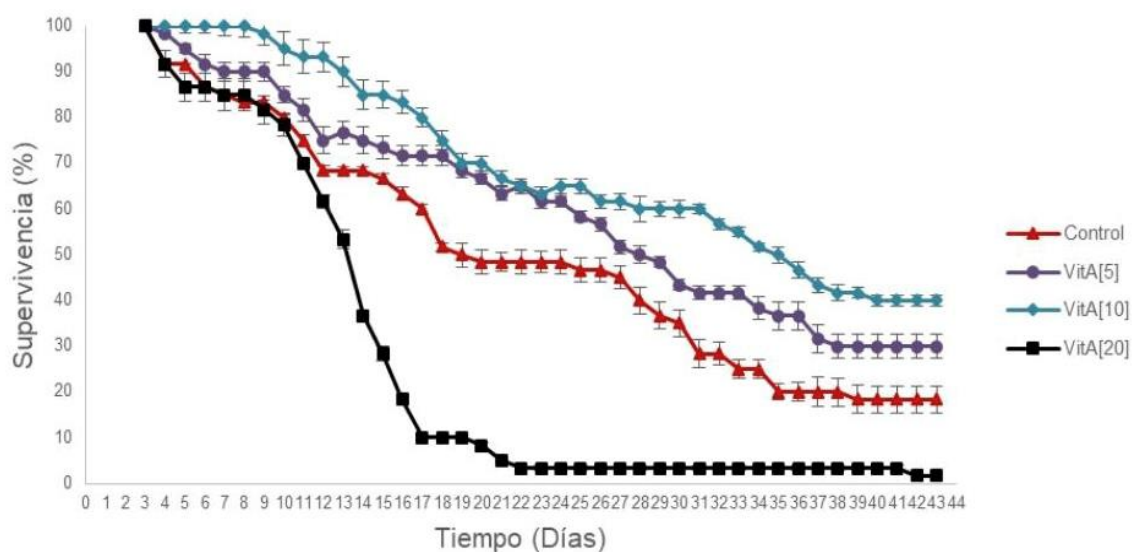


Figura 3. Supervivencia (%) de larvas de *M. acanthurus* alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecidos con diferentes concentraciones de vitamina A. Cada punto representa la media de tres repeticiones \pm el error estándar.

4. Aditivos

Recientemente Varela *et al.* (2021) reportaron el uso de dos prebióticos en el alimento de postlarvas del langostino. Los prebióticos son compuestos no-digeribles que tienen un efecto positivo en la microbiota del hospedero y que puede generar una mejor respuesta inmunológica ante alguna enfermedad, además de mejorar el crecimiento. En el estudio se adicionaron fructooligosacaridos (FOS) y mananoligosacaridos (MOS) en una concentración de 3% y no se observaron diferencias en el crecimiento con respecto al grupo control alimentado con el alimento basal. Interesantemente, los autores reportaron que la adición de los prebióticos parece tener un efecto positivo sobre la maduración sexual de los organismos. Al término de la prueba de alimentación el grupo alimentado con los MOS tuvo 37.5% de hembras ovadas, 37.5% de machos y 25% de organismos juveniles, mientras que el grupo control solo se observaron machos (50%) y organismos juveniles (50%). Es posible que la adición de los prebióticos tenga un efecto positivo sobre el aprovechamiento de los nutrientes y este, a su vez, ayude en la maduración sexual y producción de huevos.

5. Ingredientes

Durante el desarrollo de las pruebas de alimentación, se han utilizado diferentes ingredientes para incorporarlos en los alimentos. Como fuente de proteína se ha utilizado continuamente caseína, una proteína derivada de la leche con un porcentaje de proteína cruda cerca al 90%. Esta fuente de proteína es adecuada para incluirse en alimentos experimentales, pero cara en exceso para adicionarse a una dieta práctica. Por otro lado, Villafuerte *et al.* (2016) reportaron el uso de harina de pescado, harina de krill y harina de soya como fuentes de proteína y de aceites de pescado y krill, así como de ácidos grasos poliinsaturados en alimentos para hembras en etapa reproductiva. Los resultados mostraron que las hembras incrementaron la deposición de proteínas y lípidos en los huevos cuando fueron alimentadas con harina y aceite de krill. Sin duda ambos productos de krill son una opción para incluirse en los alimentos, aunque su precio es también alto para considerarse como únicas fuentes de proteína y lípidos.

6. Conclusiones

Los resultados hasta ahora obtenidos a lo largo de 10 años de la investigación en el Laboratorio de Producción Acuícola con *M. acanthurus*, nos ha dejado con más preguntas que las respuestas que hemos obtenido. Sin embargo, consideramos que hemos avanzado en la determinación de los niveles adecuados de proteína, lípidos y carbohidratos para ser incluidos en alimentos para el crecimiento y desarrollo de juveniles de esta especie. Con ello es posible utilizar diferentes ingredientes y usarlos en formulaciones más prácticas.

Otro aspecto importante es la optimización de la alimentación durante el desarrollo larvario, uno de los cuellos de botella para el desarrollo del cultivo como ya se mencionó. El uso de alimento vivo y particularmente de nauplios de *Artemia* es obligado durante toda la etapa larvaria, ya que hasta el momento no se ha logrado que las larvas consuman microdietas o algún otro tipo de alimento balanceado. Considerando esto, se utilizaron vitaminas C y A que han ayudado a incrementar la supervivencia durante la etapa larvaria y demostrando que ambos compuestos son indispensables en el desarrollo, en especial la vitamina A. Esta molécula podría tener un rol similar al que se ha reportado en vertebrados, aunque los mecanismos podrían ser diferentes.

Finalmente, señalamos que se continúa con la investigación en estos organismos en varios aspectos como la determinación de los requerimientos de aminoácidos en postlarvas, el uso de ingredientes económicos y disponibles para incluirse en alimentos para la engorda, mejora de formulaciones para reproductores, así como la optimización de nutrientes en el alimento vivo para mejorar los índices de supervivencia durante la etapa larvaria. Así mismo, se han implementado nuevas tecnologías, como la expresión de genes, con el objetivo de entender con mayor claridad el efecto de los nutrientes en los organismos.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA-UNAM, proyecto IN203121 por el apoyo para la realización de esta investigación.

Referencias

- Albertoni E., Palma C., Esteves F. 2002. Distribution and growth in adults of *Macrobrachium acanthurus* Wiegmann (Decapoda, Palaemonidae) in a tropical coastal lagoon, Brazil. *Rev. Bras. Zool.* 19: 61-70.
- Albertoni E., Palma C., Esteves F. 2003. Overlap of dietary niche and electivity of three shrimp species (Crustacea, Decapoda) in a tropical coastal lagoon (Rio de Janeiro, Brazil). *Rev. Bras. Zool.* 20:135-140.
- Castillo D.M. 2021. Efecto de la vitamina A sobre el desarrollo larvario del langostino *Macrobrachium acanthurus*. Tesis de licenciatura, Carrera de Biología, UNAM FES Iztacala. pp.
- Chen H.Y. 1993. Recent advances in nutrition of *Penaeus monodon*. *J. World Aquacult. Soc.* 24: 251-256,
- De Almeida E.O., Santos R.B., Coelho-Filho P.A., Cavalcante-Junior A., Souza A.P.L., Soares E.C. 2015. Poly culture of curimatã pacu and freshwater prawn. *Bol. Inst. Pesca.* 41: 271-278.
- Frías G.S.A. 2020. Evaluación de tratamientos con diferentes porciones de proteína, lípidos y carbohidratos en poslarvas del langostino *Macrobrachium acanthurus*. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. México. Pp.
- García-Guerrero, M.U., Becerril-Morales, F., Vega-Villasante F., Espinosa-Chaurand L.D. 2013. Los langostinos del género *Macrobrachium* con importancia económica y pesquera en América Latina: conocimiento actual, rol ecológico y conservación. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 41: 651-675.
- Hernández-Abad G.Y., Hernández-Hernández L.H., Fernández-Araiza M.A. 2018. Effects of different dietary lipids concentrations on the egg production and egg quality produced by *Macrobrachium acanthurus* females. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 46: 518-514.
- Hernández H.L.H., Padilla B.A.J., Fernández A.M.A., Angeles L.O. 2015. Avances en requerimientos nutricionales de langostinos nativos. En: Cruz-Suaréz L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Nieto-López M.G., Villareal-Cavazos D.A., Gamboa-Delgado J., Rivas-Vega M., Miranda-Baeza M (eds). *Nutrición Acuícola: Investigación y desarrollo*. UANL. Nuevo León, México. pp 82-93.
- Hernández H.L.H., Hardy R.W. 2020. Vitamin A functions and requirements in fish, *Aquacult. Res.* 51: 3061-3071.
- Kutty M.N., Valenti W.C. 2010. Culture of other freshwater prawn species. In: New, M.B, Valenti W.C., Tidwell J.H, D´Abramo L.R., Kutty M.N. (Eds). *Freshwater prawns: biology and farming*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 502-523.
- Lorán-Núñez R.M. 2017. Observaciones de la pesquería de langostinos (*Macrobrachium* sp.) en el estado de Veracruz, México. *Ciencia Pesquera*, 25: 31-34.
- Soares E., De Almeida E.O., Araújo K., De Lima M., Gusmao-Júnior L., De Oliveira W.D., Lima S.E. 2019. Polyculture of curimatã-pacu (*Prochilodus argenteus*) and canela shrimp (*Macrobrachium acanthurus*) feed with dehydrated cassava leaf meal. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 47: 27-33.
- Tamborus A., Mussolin E., Mantelatto F. 2012. Population and productive aspects of *Macrobrachium acanthurus* (Weismann 1836; Crustacea: Palaemonidae) from north coast of São Paulo State, Brazil. *Bra. J. Aquat. Sci. Technol.* 16: 9-18.
- Teshima S.I., Koshio S., Ishikawa M., Alamilla M.S., Hernández H.L.H. 2006. Protein requirements of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* evaluated by the factorial method. *J. World Aquacult. Soc.* 37: 145-153.

- Varela-Granados Y., Frías-Gómez S.A., Hernández-Hernández L.H., Powell M.S., Vega-Villasante F. 2021. Effects of manan oligosaccharides and fructooligosaccharides on the growth and nonspecific immune responses of juvenile freshwater prawn *Macrobrachium acanthurus*. Lat. Am. J. Aquat. Res. 49: 299-306.
- Villafuerte M.A., Hernández H.L.H., Fernández A.M.A., Angeles L.O. 2016. Contribución al conocimiento de los requerimientos nutricionales del langostino nativo *Macrobrachium acanthurus*. Hidrobiológica. 26: 15-23.
- Yamasaki-Granados S., Ruiz-Fregozo M., Vega-Villasante F., Espinosa-Chaurand L.D., Cortés-Jacinto E., Oliva-Suárez M. 2012. Contribution to the biology of molting and growth of prawn *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871) (Decapoda: Palaemonidae). Arch. Biol. Sci. 64: 651-658.

Valorización de Macroalgas para su Uso como Alimento Acuícola

Alberto Peña-Rodríguez^{1*}, Alexia Omont², Regina Elizondo-González¹

¹Investigador CONACYT-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Instituto Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B.C.S., 23096, México.

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Instituto Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B.C.S., 23096, México.

*Autor de correspondencia: Tel: (52) 612 123 8484 ext: 3922, E-mail: apena@cibnor.mx

Resumen

Las macroalgas representan una fuente barata y renovable de nutrientes valiosos para la alimentación de especies acuícolas. Aun cuando el uso de macroalgas en los alimentos acuícolas ha demostrado tener beneficios importantes en el cultivo de diversas especies, el nivel de inclusión de las mismas es limitado principalmente asociado a los altos niveles de fibra insoluble que reduce la digestibilidad del alimento. Los procesos de valorización que permiten eliminar o transformar esta fibra insoluble en las macroalgas, se presentan como potenciales alternativas para un mejor aprovechamiento de estos recursos que resultan en beneficios para el rendimiento de los cultivos acuícolas. En el presente trabajo se revisan los avances en procesos de valorización basados en tres estrategias: fermentación, producción de detritos unicelulares y los concentrados y extractos altos en proteína a partir de macroalgas marinas. A pesar de tener avances significativos en la investigación sobre la valorización de macroalgas marinas y su beneficio en la nutrición de especies de importancia acuícola, aún queda un gran trabajo por desarrollar en el estudio de la gran diversidad de especies de macroalgas disponibles de forma silvestre y producidas por acuicultura.

Palabras clave: *biotecnología acuícola, ingredientes alternativos, macroalgas, nutrición.*

1. Introducción

De acuerdo con la FAO (2021) para el 2019, la producción mundial de macroalgas se situó en 34 millones de toneladas, siendo más del 95% generada por acuicultura, la cual presenta un crecimiento sostenido en las últimas décadas, mientras que la captura de macroalgas del medio natural se ha estancado (Nayar y Bott, 2014). La producción se ha expandido desde el sur-este de Asia al norte de Europa, Canadá, este de África y Latino América (Alemañ *et al.*, 2019). Los principales productos obtenidos de las macroalgas son la carragenina, alginatos y agar, y en menor medida fertilizantes, harinas integrales y compuestos biológicos con aplicación farmacológica, cosmetológica, nutracéutica, entre otras (Nayar y Bott, 2014). En la industria de alimentos para consumo humano, han comenzado una expansión de su uso a nivel mundial debido a sus características culinarias (Figueroa *et al.*, 2021) y su inclusión en la categoría de súper alimentos saludables (Nehal, 2014; Rajauria y Yuan, 2021).

Por otro lado, el rápido crecimiento de la acuicultura en los últimos años, es el resultado de la intensificación de los sistemas de producción y el uso de alimentos balanceados de buena calidad. Sin embargo, el alimento balanceado representa el costo operacional más alto en la industria acuícola, principalmente debido al uso de harina de pescado (Ogello *et al.*, 2014), la cual es utilizada en las formulaciones principalmente por su composición nutricional alta en proteína y excelente perfil de aminoácidos y ácidos grasos (Watanabe 2002). En este contexto, las macroalgas representan una potencial fuente de nutrientes de bajo costo, con un gran interés de investigación como alternativa a ingredientes de origen animal. En general, las macroalgas frescas o en harina, no pueden ser empleadas como única fuente de alimento para peces (An y Anh, 2020; Soler-Vila *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2006), crustáceos (Gamboa-Delgado *et al.*, 2011; Marinho-Soriano *et al.*, 2007) o moluscos (Omont *et al.*, 2021a, b), principalmente por los bajos niveles de lípidos que presentan. Sin embargo, pueden ser incluidas de forma parcial en la dieta, con resultados variables dependiendo de la inclusión y la especie de macroalga, y del organismo que se quiere alimentar. Cuando se utiliza el alga fresca en combinación con alimento balanceado peletizado, se ha observado una mejora en la tasa de crecimiento y la eficiencia de utilización de alimento; por ejemplo, en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Cruz-Suarez *et al.*, 2010), camarón café *Farfantepenaeus californiensis* (Peña-Rodríguez *et al.*, 2017; Portillo-Clark *et al.*, 2012) y en la tilapia *Oreochromis niloticus* (An y Anh, 2020).

Sin embargo, aun cuando el cultivo acuícola integrado con macroalgas presenta beneficios en el crecimiento y en el uso eficiente del alimento para algunos peces y crustáceos, la implementación del cultivo de la macroalga conlleva varios retos que incluyen: la disponibilidad de especies, la tecnología y capacitación en su cultivo, y la compatibilidad entre condiciones cultivo de las especies seleccionadas (p. ej. la temperatura). Es por ello que el uso de harina de macroalga parece más viable para su inclusión en la dieta de los organismos cultivados. Por ejemplo, el uso de *Sargassum polycystum* incluido en niveles de entre 1.5 y 4.5% en el alimento mejoró el crecimiento del barramundi *Lates calcarifer* comparado con un alimento control (Nazarudin *et al.*, 2020). En camarón blanco *L. vannamei*, la inclusión de 3% de *Ulva lactuca* en el alimento, permitió un aumento significativo del crecimiento respecto a camarones alimentados sin macroalga (Elizondo-González *et al.*, 2018).

Por otro lado, la utilización de harinas integrales de macroalgas no siempre resulta en un mejor rendimiento para los organismos acuícolas en términos de crecimiento, sin embargo, se han visto diferentes efectos benéficos a nivel fisiológico. Las macroalgas contienen diversos metabolitos biológicamente activos con una gran variedad de propiedades como antivirales, antimicrobianos, antioxidantes e inmunoestimulantes (Dubey y Sivaraman, 2021; Michalak y Chojnacka, 2015; Teles *et al.*, 2021), a partir de compuestos como polisacáridos sulfatados, polifenoles, carotenoides, esteroides, entre otros (Kumar, 2008; Pal *et al.*, 2014). Por ejemplo, la inclusión de 0.5% de harina de *Sargassum filipéndula*, aumentó la superficie del epitelio intestinal en el camarón *L. vannamei* (Schleder *et al.*, 2018), y permitió reducir sustancialmente la mortalidad a 96 h de ser infectados con el virus del síndrome de la mancha blanca en la misma especie de camarón (Schleder *et al.*, 2020). En el ostión japonés *Crassostrea gigas*, se puede reemplazar hasta un 25% de microalga con harina de *Ulva rigida*, sin alterar el proceso de maduración gonadal (Rato *et al.*, 2018). También se ha visto que la inclusión de 3.5% de la macroalga roja *Pyropia columbina* en el alimento, resultó en una menor peroxidación lipídica y actividad superóxido dismutasa en el intestino de juveniles de Pacú *Piaractus mesopotamicus* (Cian *et al.*, 2019).

De acuerdo a los resultados obtenidos en diversos estudios sobre el uso de harinas integrales de macroalgas en los alimentos, particularmente en peces y crustáceos, se sugiere que el límite de inclusión en los alimentos se sitúa entre el 5 y el 10%, conservando beneficios a nivel fisiológico sin afectar el crecimiento de los organismos. Esta limitante es atribuido en parte al alto contenido de fibra insoluble presente en las macroalgas, que pueden afectar a la digestibilidad del alimento

(Evans and Critchley 2014; Katayama *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012; Rodríguez-González *et al.*, 2014; Santizo *et al.* 2014; Valente *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2009).

2. Procesos de valorización de macroalgas para su uso acuícola

Actualmente, se ha intensificado la investigación sobre el desarrollo de procesos de valorización que permitan mejorar la calidad nutricional y eliminar los compuestos antinutricionales de las macroalgas, con la finalidad de aumentar su nivel de inclusión en las dietas, con miras a sustituir ingredientes de origen animal como la harina de pescado para el caso de peces y crustáceos, así como para sustituir microalga en la alimentación de moluscos. Los principales procesos de valorización de macroalgas son la fermentación, la producción de detritos unicelulares, y la extracción o concentración de compuestos de alto valor nutricional (Figura 1).

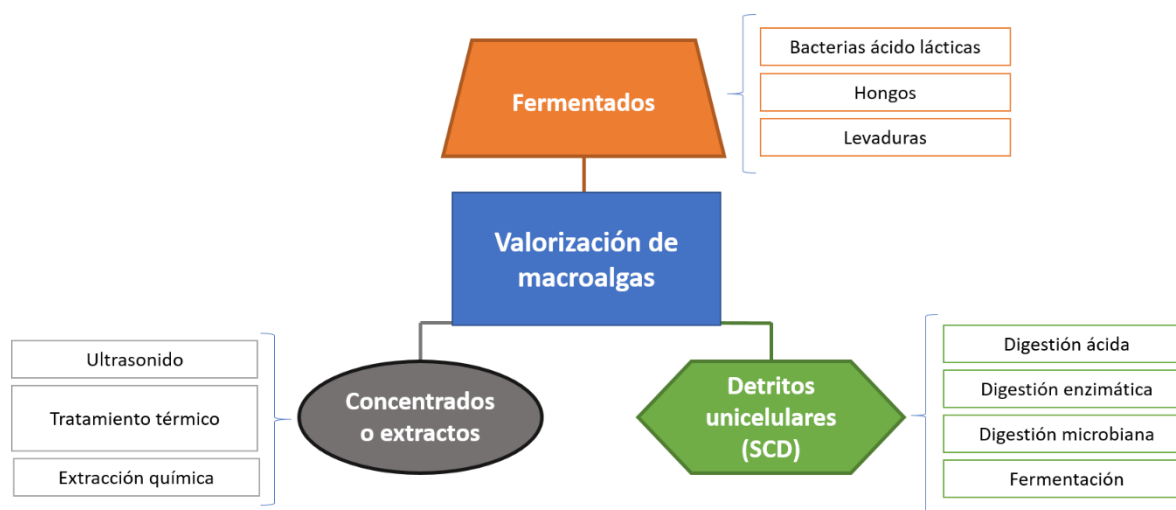


Figura 7. Procesos de valorización de macroalgas para su uso acuícola.

2.1. Fermentados de macroalgas

La fermentación de macroalgas es empleada en la industria de alimentos para consumo humano, principalmente en la preparación de salsas (Uchida *et al.*, 2017;2018) y bebidas (Prachyakij *et al.*, 2008; Ratanaburee *et al.*, 2011). De forma emergente, se comienza a emplear también como alimento en producción animal (Choi *et al.*, 2014; Hui *et al.*, 2021; Santoso *et al.*, 2016) incluyendo a la industria acuícola (Tabla 1). Se ha visto que la fermentación permite aumentar la biodisponibilidad de compuestos activos, además de biotransformar algunos de sus compuestos para obtener un mayor valor nutricional (Reboleira *et al.*, 2021). Para estandarizar la

fermentación, se suele incluir fuentes adicionales de nitrógeno como harina de soya y de carbono como glucosa, dextrosa, harina de papa y melaza (Felix y Brindo, 2014a,b; Felix y Pradeepa, 2011, 2012)

Se ha reportado por distintos autores, que el proceso de fermentación en las macroalgas resulta en un incremento remarcable en el contenido de proteína (hasta 70% más proteína) y lípidos (hasta 200% más lípidos), atribuido a la biomasa microbiana producida durante el proceso (Felix y Brindo, 2014; Hardjani *et al.*, 2017; Ilias *et al.*, 2015). En contraste, los niveles de fibra cruda disminuyen, facilitando una mayor digestibilidad de los nutrientes respecto al empleo de harinas de macroalgas integrales. De acuerdo con Felix y Brindo (2014a), en el langostino gigante de río *Macrobrachium rosenbergii*, la inclusión de 10, 20 o 30% de *Kappaphycus alvarezii* fermentada en el alimento, resultó en un incremento significativo en la digestibilidad aparente de material seca, proteína y lípidos, respecto al uso de la macroalga sin fermentar a los mismos niveles de inclusión y un alimento control sin inclusión de macroalga. Así mismo, el uso de *K. alvarezii* fermentada en el alimento resultó en un aumento significativo en el crecimiento de *M. rosenbergii* respecto al alimento sin macroalgas. De acuerdo con Yang *et al.* (2016), en la tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*), la inclusión del 3, 4 y 5% de un fermentado de *Enteromorpha prolifera* en el alimento, permitió un peso final y tasas de crecimiento significativamente mayores que en organismos alimentados con un alimento control sin macroalga. La inclusión de 10% y 20% de *U. lactuca* fermentada como sustituto parcial de la harina de pescado en el alimento, no afectó la supervivencia, tasa de crecimiento, ni el factor de conversión alimenticia de *L. vannamei* después de 30 días de alimentación (Omont *et al.*, 2021a).

Por otro lado, el origen y calidad nutricional de los ingredientes dietarios pueden afectar la digestibilidad de los alimentos balanceados, y en el caso de las macroalgas, una pre-digestión o degradación de las paredes celulares pueden beneficiar su aprovechamiento. El uso de enzimas digestivas como la celulosa, permite incrementar la eficiencia de fermentación de las macroalgas por levaduras ácido lácticas (Felix y Pradeepa, 2012), con la que se eliminan carbohidratos indigestibles y potenciales compuestos antinutricionales (Refstie *et al.*, 2005). De acuerdo con Omont *et al.*, (2021a), la inclusión en el alimento de 10 y 20% de *U. lactuca* o *Eisenia sp.*, previamente pre-digeridas con celulosa, y fermentadas con *Lactobacillus sp.* y *Saccharomyces cerevisiae*, mejoró la actividad enzimática digestiva de tripsina y amilasa, y en el caso de *U. lactuca* además aumentó la actividad lipasa en el hepatopáncreas de *L. vannamei* (Omont *et al.*, 2021a). La

tripsina es una de las principales proteasas digestiva en crustáceos, y cuya actividad está fuertemente relacionada a la calidad y cantidad de la proteína (Hernández y Murueta, 2009). Un incremento en la actividad enzimática digestiva de amilasa y lipasa de *L. vannamei* también se ha reportado con la inclusión de 4% de *Undaria pinnatifida* en el alimento (Schleder *et al.*, 2018). En la tilapia roja (*O. mossambicus* x *O. niloticus*), la inclusión de entre 2 y 4% de fermentado de *E. proliferans* en el alimento aumentó significativamente la actividad digestiva gástrica e intestinal de amilasa y lipasa respecto a un tratamiento control sin alga, después de 7 semanas de alimentación (Yang *et al.*, 2016). El aumento en la actividad de enzimas digestivas indica que el proceso de pre-digestión permite mejorar la calidad o biodisponibilidad de los nutrientes presentes en la macroalga.

Independientemente del uso de celulosa para la pre-digestión de las macroalgas, los microorganismos utilizados para la fermentación usualmente presentan buena actividad enzimática digestiva extracelular. En el caso de los hongos como *Rhizopus sp.*, presentan buena actividad enzimática extracelular amilolítica (glucoamilasa) que puede hidrolizar en enlaces α -1,4 and α -1,6 de la amilosa y amilopectina (Nahar *et al.*, 2008) que ayudan a romper las paredes celulares de las macroalgas para convertirlos en ácidos orgánicos (Aslamyiah y Karim, 2017). El uso de otros hongos marinos como *Paradendryphiella salina*, permite incrementar la concentración de proteína (>100%) y reduce los carbohidratos incluyendo la celulosa, además de aumentar los compuestos fenólicos y actividad antioxidante de *Macrocystis pryorifera*, respecto al uso de la macroalga sin fermentar (Salgado *et al.*, 2021).

La combinación o cocteles de microorganismos también es una práctica empleada para eficientar el proceso de fermentación. El uso de *Bacillus sp.*, *Rhizopus sp.* y *Lactobacillus sp.* para fermentar diversas macroalgas, se ha reportado que aumentan su digestibilidad de la materia seca y de la materia orgánica (Aslamyiah y Karim, 2017). La fermentación en estado sólido también es una opción para el procesamiento de la macroalgas. De acuerdo con Ilias *et al.* (2015), la fermentación en estado sólido de *Sargassum fulvellum*, empleando el hongo *Phanerochaete chrysosporium* y la levadura *Candida utilis*, a una humedad de 70% adicionada con una pre-mezcla mineral, permitió un incremento de 39% en el contenido de proteína. También se ha observado que la inclusión de macroalgas fermentadas en el alimento, puede beneficiar un mayor consumo del alimento (Felix y Brindo, 2014a). La fermentación de las algas es un método sencillo y económico,

y su inclusión en el alimento actúa como promotor del crecimiento, potenciador inmunológico y probióticos en organismos cultivables (Felix y Brindo, 2014b).

En la parte de la microbiota digestiva, Omont *et al.* (2021a) mencionan que el consumo de *U. lactuca* pre-digerida y fermentada, se relaciona positivamente con cambios en las comunidades bacterianas en el intestino del camarón *L. vannamei*, resultando en un incremento significativo en la abundancia relativa de las bacterias del grupo *Bacteroidetes*, órdenes *Actinomycetales*, *Sphingomonadales*, *Bacillales* y *Clostridia*, especialmente el género *Clostridium*, en los cuales se encuentran una variedad de bacterias celulolíticas (Omont *et al.*, 2021a). Por otro lado, en ese mismo estudio se observó que disminuye la abundancia en géneros bacterianos potencialmente patógenos como *Tenacibaculum*, que se ha reportado enriquecido en el intestino del camarón infectado con la enfermedad "camarón de algodón" (Zhou *et al.*, 2019); del género *Lutimonas* abundantes en el esqueleto de langostas enfermas (Feinman *et al.*, 2017); de la familia *Vibrionaceae*, particularmente las bacterias de los géneros *Lucibacterium* asociados con vibriosis luminosa y el síndrome Bolitas nigricans (Austin y Zhang, 2006); y *Allomonas* asociados al síndrome de las heces blancas en los camarones (Kumara y Hettiarachchi, 2017).

Tabla 1: Estudios sobre el uso de fermentados de macroalgas como ingredientes en la dieta de organismos de importancia acuícola.

Macroalga	Microorganismos	Organismo alimentado	Condiciones de fermentación	Resultados	Referencia
<i>Ulva lactuca</i>	<i>Lactobacillus</i> spp. y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	pH 4, 72h, dextrosa 5%	Hasta 30% de reemplazo de la harina de pescado y otros ingredientes	Felix y Brindo, 2014a
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	<i>Lactobacillus</i> spp. y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	60°C / 48 h, pH 4.	Hasta 30% de inclusión mejora el crecimiento. Mayor digestibilidad del alimento y crecimiento respecto al control	Felix y Brindo, 2014b
<i>Ulva lactuca</i> y <i>Eisenia</i> sp.	<i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	35°C /48 h, 1% azúcar, harina de soya y almidón.	10 o 20% de inclusión sin afectar el crecimiento en remplazo de h. de pescado, mejora actividad digestiva	Omont <i>et al.</i> , 2021a
<i>Kappaphycus alvarezii</i> , <i>Gracilari gigas</i> , <i>Sargassum</i> sp. y <i>Cauleroa</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp. y <i>Saccharomyces</i> sp.	Sugerido para peces	72 h, 20% v/p de melaza, inactivación con agua hirviendo 1-2 min.	Aumento en la digestibilidad de materia seca y de materia orgánica. Incremento de porcentaje de proteína del alga.	Aslamyah y Karim, 2017
<i>Caulerpa lentillifera</i> , <i>Eucheuma cottonii</i> y <i>Sargassum fulvellum</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Candida utilis</i>	Sugerido para peces	70% de humedad, 32°C/6 días, fermentación en estado seco.	Incremento en contenido de proteína del alga.	Ilias <i>et al.</i> , 2015
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	26-28°C/72 h, 125 rpm.	Incremento en concentración de proteína y lípidos del alga.	Hardjani <i>et al.</i> , 2017
<i>Enteromorpha prolifera</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i> x <i>Oreochromis niloticus</i>	30°C/5 días, 1 g kg ⁻¹ de celulasa.	La inclusión de 3, 4 y 5% de fermento mejoró el crecimiento, eficiencia de utilización de alimento, la actividad enzimática digestiva y la respuesta inmune no específica de la tilapia.	Yang <i>et al.</i> , 2016

2.2. Producción de detritos unicelulares o SCD (*single cell detritus*)

Dentro de los procesos de valorización de macroalgas para su uso como alimento acuícola, se encuentra la producción de detritos unicelulares (SCD, por sus siglas en inglés) (Tabla 2). Este término acuñado así por Uchida (1996), surgió a partir de su trabajo con la degradación de *Laminaria japónica* con una cepa de *Alteromonas* sp. con las que obtuvo partículas de entre 4-10

µm. Reducir las algas a nivel celular mejora su digestibilidad a través de la degradación de la fibra, proporciona partículas ricas en proteínas y elimina los efectos nocivos de los antinutrientes de la macroalga integral (Cruz-Suárez *et al.*, 2008; Felix y Pradeepa, 2012; Francis *et al.*, 2001).

El uso de SCD se ha propuesto como una potencial fuente de alimento para organismos suspensívoros (Felix y Pradeepa, 2011; Omont *et al.*, 2021b; Peña Rodríguez *et al.*, 2020; Pérez Camacho *et al.*, 2007; Rato *et al.*, 2018; Tanyaros y Chuseingjaw, 2016; Uchida y Murata, 2002). Su costo relativamente bajo y la menor necesidad de mano de obra para su producción, abren el camino para agregar valor a este recurso marino subdesarrollado (Uchida y Numaguchi, 1998). Más allá de su uso directo como alimento, los SCD han demostrado ser un ingrediente prometedor para su uso en alimentos formulados, como fuente superior de proteínas y lípidos (Harel *et al.*, 2007), los cuales se han probado en organismos detritívoros (Felix y Pradeepa, 2011).

La producción de SCD puede variar en su proceso, pudiendo emplearse ósmosis inversa, digestión química y/o enzimática, además del uso de microorganismos (fermentación o digestión aeróbica). El uso de ósmosis inversa para la producción de SCD descrito por Tanyaros y Chuseingjaw (2016), se basa en la hidratación con agua dulce de harina de macroalga puesta en agitación, para posteriormente filtrar a un tamaño de partícula de 20 µm, obteniendo un 20% de partículas con un diámetro inferior a 10 µm. Con este método encontraron que con SCD de *Porphyra haitanensis* es posible reemplazar hasta un 50% de microalga en maternidades del ostión tropical *Crassostrea belcheri*. Otro trabajo empleando osmosis inversa para la producción de SCD a partir de *Gracillaria tenuistipitata* y *Enteromorpha sp.*, demostró que un reemplazo de hasta 50% de alimento para larvas de camarón, mejoraba la supervivencia y características reproductivas de *Artemia franciscana* a los 21 días de cultivo.

Para el caso del proceso de digestión química o enzimática, el protocolo inicia con la rehidratación de harinas de macroalgas. En la mayoría de los casos, la rehidratación se realiza con agua destilada o desionizada a una proporción de 10% peso/volumen (Carboni *et al.*, 2016; Felix y Pradeepa, 2011, 2012; Pérez Camacho *et al.*, 2004). El tratamiento químico consiste en la reducción del pH con la utilización de ácido clorhídrico (Pérez Camacho *et al.*, 2004). La digestión química permite hidratar las estructuras orgánicas de las partículas secas de macroalga, transformar las sales insolubles en solubles e hidrolizar los polisacáridos complejos, preparando las partículas para su posterior tratamiento (Pérez Camacho *et al.*, 2004). Pérez Camacho *et al.* (2004) demostraron que la aplicación de un tratamiento ácido antes de la digestión enzimática para

producir detritos de *Laminaria saccharina* ayudó en aumentar un 24.8% las proporciones en partículas de diámetro inferior a 10 µm. Cuando se realiza una digestión enzimática sin tratamiento ácido previo, es posible utilizar agua con secuestrantes de iones de calcio para facilitar la acción de las enzimas digestivas (Pérez Camacho *et al.*, 2007). Las principales enzimas que se emplean durante este proceso son celulasas (Felix y Pradeepa, 2011, 2012; Uchida y Murata, 2002) y endoglucanasas (Pérez Camacho *et al.*, 2004, 2007), que ayudan a degradar la fibra dietética insoluble presente en las paredes celulares de las macroalgas. De acuerdo con Omont *et al.* (2021b), la digestión ácida y enzimática de *U. lactuca*, permitió reducir el tamaño de las partículas hasta alcanzar más del 87% con un rango de tamaño entre 1 y 10 µm. Con este método encontraron que el uso de SCD de *U. lactuca*, permite hasta un 50% de reemplazo de *Chaetoceros calcitrans* sin afectar el crecimiento ni el índice de condición del ostión Japonés *C. gigas*.

A estos procesos, se puede combinar el uso de microorganismos para la producción de SCD. En un proceso de digestión bacteriana aeróbica, se emplean microorganismos con actividad enzimática digestiva alginolítica, celulítica y/o proteolítica, los cuales se incorporan en un biorreactor durante 12 a 48 horas (Uchida *et al.*, 1997; Pérez Camacho *et al.*, 2004, 2007). De acuerdo con Pérez Camacho *et al.* (2004, 2007), el proceso de fermentación demostró una alta eficiencia de degradación de las fibras de celulosa y polisacáridos de las paredes celulares de *L. saccharina*, conservando los fosfolípidos en la membrana celular y dejando intactas las células del tejido de la macroalga. Las partículas producidas resultaron en un tamaño del 85% entre 2 y 20 µm, facilitando su ingestión en la almeja *Ruditapes decussatus* (Pérez Camacho *et al.*, 2004). Los SCD de *L. saccharina* pueden reemplazar entre el 80% y el 90% del contenido de fitoplancton vivo en la alimentación de *R. decussatus*, con tasas de crecimiento iguales, e incluso superiores, a las resultantes de dietas de fitoplancton vivo (Pérez Camacho *et al.*, 2007).

En el caso del proceso de fermentación para la producción de SCD, se usan principalmente bacterias ácido lácticas y levaduras (Uchida y Murata, 2002; Felix y Pradeepa, 2011). Estos organismos pueden aislarse de las algas fermentadas naturalmente o de otras fuentes (Uchida *et al.*, 2004). En efecto, se ha observado que las partículas de algas están asociadas con muchas células bacterianas (Uchida *et al.*, 1997). La combinación de bacterias ácido lácticas y levadura tiene un efecto sinérgico: la producción de ácido láctico ayuda a preservar el SCD por largos periodos y reduce la prevalencia de microbios patógenos en el proceso de producción (Felix y Pradeepa, 2012; Uchida *et al.*, 2004). No obstante, para el uso de SCD como fuente alimenticia en el cultivo de

ostiones, es preferible la ausencia de actividad bacteriana para la preparación de detritos (Omont *et al.*, 2021b; Pérez Camacho *et al.*, 2004; Uchida y Murata, 2002). En el caso de otros organismos, las bacterias ácido lácticas también actúan como probióticos y, por lo tanto, ayudan a aumentar la supervivencia de los organismos y a mantener la calidad del agua. La levadura actúa predominantemente como un agente biorremediador, lo que permite que los sistemas de cultivo se ejecuten con poco o ningún intercambio de agua (Felix y Pradeepa, 2012). Anteriormente se abordó que la fermentación de las macroalgas produce un aumento en el contenido de proteína, y en el caso de no emplearse para la elaboración de SCD, este efecto se ve reducido. Como lo reportado por Omont *et al.* (2021b), donde la ausencia del proceso de fermentación reduce el incremento en el contenido de proteínas del SCD a solo 20% más comparado con la harina cruda de *U. lactuca*.

En el caso de moluscos, el reemplazo de microalgas con SCD para los procesos en el laboratorio ha dado resultados positivos. La sustitución del 100% de microalgas por SCD de *U. lactuca* resultó en un alto porcentaje de supervivencia en ostiones *C. gigas* después de 17 días del inicio del experimento (Peña-Rodríguez *et al.*, 2020). De acuerdo con Omont *et al.* (2021b), los ostiones alimentados con una sustitución parcial o total de microalgas con detritos de *U. lactuca*, presentaron un 100% de supervivencia después de 35 días del experimento, sin diferencias significativas en comparación con el tratamiento de control. Teniendo en cuenta los parámetros de crecimiento, la sustitución de hasta el 50% de las microalgas con SCD de *U. lactuca* resultó en una longitud de concha, pesos vivo y seco, y una tasa de crecimiento específica similares a los ostiones con un régimen de alimentación al 100% de microalgas. Las mismas observaciones sobre el crecimiento se han realizado con juveniles de *Callionymus belcheri* alimentados con SCD de *Porphyra haitanensis* como sustituto al 50% de las microalgas (Tanyaros y Chuseingjaw, 2016). Pérez Camacho *et al.* (2007) demostraron que existe un efecto aditivo cuando los SCD se suplementan con un 10% de fitoplancton vivo, obteniendo tasas de crecimiento similares a las logradas con el 100% de fitoplancton vivo. Por otro lado, la alimentación total o parcial con SCD de *U. lactuca* han demostrado modificar las actividades enzimáticas digestivas de los organismos; en ostiones *C. gigas* (Omont *et al.*, 2021b; Peña Rodríguez *et al.*, 2020) se ha observado un incremento en la actividad de las proteasas y lipasas en el aparato digestivo de los organismos.

En el caso de peces, existen trabajos que sugieren el uso de SCD para alimentación principalmente en etapas larvarias (Mann, 1988; Uchida *et al.*, 2002) sin embargo es limitado el conocimiento sobre su aplicación en este grupo de organismos. En las etapas larvarias de los peces

se requieren grandes cantidades de microalgas, ya sea para alimentar directamente a las larvas, o para enriquecer zooplancton. De acuerdo con Yin et al. (2013), el uso de SCD a partir de *Ulva pertusa* mejoró el contenido de aminoácidos libres, ácidos grasos poliinsaturados el rotífero *Brachionus plicatilis*, el cual es ampliamente utilizado en alimentación larvaria de peces.

Tabla 2. Estudios sobre el uso de detritos unicelulares o SCD producidos a partir de macroalgas como alimento acuícola.

Macroalga	Organismo alimentado	Condiciones de producción	Resultados	Referencia
<i>Ulva lactuca</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	Digestión ácida (HCl, pH 1.5, 40°C, 4 h) Digestión enzimática (5%, pH 5, 55°C, 24h, 120 rpm)	Hasta 50% de reemplazo de <i>Chaetoceros calcitrans</i>	Omont et al., 2021b
<i>Ulva lactuca</i> , <i>Ulva clathrata</i> y <i>Porphyra</i> sp.	<i>Crassostrea gigas</i>	Digestión enzimática (55°C, 1h, 50 rpm) Fermentación (<i>L. plantarum</i> + <i>S. cerevisiae</i> , 37°C, 48h, 40 rpm, 1% azúcar, harina de soya y almidón de maíz)	Reemplazo total de <i>Isochrysis galbana</i> o <i>C. calcitrans</i>	Peña Rodríguez et al., 2020
<i>Saccharina latissima</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	Digestión ácida (HCl, pH 5.2, 121°C, 15 min) Digestión enzimática (10%, 45°C, 48h, 200 rpm)	Hasta 50% de reemplazo de microalga	Carboni et al., 2016
<i>Porphyra haitanensis</i>	<i>Crassostrea belcheri</i>	Agitación a 100 rpm, 2h, filtrado a 20 µm, Ósmosis inversa a 30 ups	Hasta 50% de reemplazo de <i>C. calcitrans</i> and <i>Tetraselmis suecica</i> en maternidades	Tanyaros y Chuseingjaw, 2016
<i>Gracillaria tenuistipitata</i> y <i>Enteromorpha</i> sp.	<i>Artemia franciscana</i>	Ósmosis inversa, fermentación con levaduras (70 mg/L glucosa, 48h).	Reemplazo de 50% de alimento para larvas de camarón, con mejora en supervivencia.	Ngo, 2019
<i>Laminaria saccharina</i>	<i>Ruditapes decussatus</i>	Digestión ácida (HCl, pH 1.5, 40°C, 24h) Digestión enzimática (36°C, 24h, pH 5.4) Digestión bacteriana (27°C, 24-48h, pH 8)	Remplazo de entre 80-90% de <i>I. galbana</i>	Pérez Camacho et al., 2007
<i>Laminaria saccharina</i>	<i>Ruditapes decussatus</i>	Digestión enzimática (37°C, 24h, pH 5.4) Digestión bacteriana (27°C, 24-48h, pH 7.8, 100 rpm)	Hasta 6% de reemplazo de <i>I. galbana</i>	Pérez Camacho et al., 2004
<i>Laminaria japonica</i>	<i>Anemia nauplii</i>	Digestión bacteriana (20°C, 24h, 360 rpm)	Reemplazo de <i>Nannochloropsis</i> sp.	Uchida et al., 1997
<i>Ulva pertusa</i>	<i>Brachionus plicatilis</i>	Pre-tratamiento (100°C, 1 min), pulverización (agua marina 15 ups), filtrado (30 µm)	Reemplazo del 50% de <i>Nannochloropsis</i> sp.	Yin et al., 2013

2.3. Concentrados y extractos proteicos de macroalgas

El incremento del uso de harina de pescado en la acuicultura y su limitada disponibilidad genera un panorama complicado para esta industria, por lo que es esencial contar con alternativas que permitan sustituir esta fuente de proteína de las formulaciones de alimento balanceado. Uno de los grandes atractivos de las macroalgas son sus propiedades funcionales, sin embargo, debe considerarse también su calidad nutricional y valor proteico (Fleurence *et al.*, 1999). El nivel de proteína de las macroalgas marinas varía entre el 8 y 20 %, dependiendo de la especie de macroalga, y en el caso del perfil de aminoácidos es mejor que otras proteínas de origen vegetal. Por ejemplo, en el caso de la metionina, proporcionalmente a los aminoácidos totales, en las macroalgas es 50 % mayor que en la harina de soya (Angell *et al.*, 2017). Es por ello, que se han demostrado excelentes resultados en el uso de diferentes especies de macroalgas ya sea de colecta o de cultivo como fuente de alimento para consumo animal (Elizondo-González *et al.*, 2018; Jerez-Timaure *et al.*, 2021; Matshogo *et al.*, 2021; Peña-Rodríguez *et al.*, 2016).

Los concentrados de proteínas a partir de material vegetal han ganado interés en los últimos años, se realizan a través de la extracción directa o indirecta que permita el incremento del contenido proteico. Sin embargo, el aislamiento y concentración a partir de macroalgas es un tema poco estudiado (Angell *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2011), por lo que no es comúnmente utilizado en la actualidad (Fleurence *et al.*, 2018). Se ha visto que componentes presentes en las macroalgas, como los compuestos fenólicos y componentes de la pared celular como celulosa, pueden interferir o dificultar el proceso de extracción proteica (Fleurence *et al.*, 1995; Ragan y Glombitza, 1986). Wong *et al.* (2001) evaluaron el contenido nutricional de concentrados proteicos obtenidos a partir de las macroalgas *Hypnea charoides*, *Hypnea japonica* y *Ulva lactuca*, demostrando que a mayor contenido de compuestos fenólicos presentes en las muestras de macroalga, menor es el porcentaje de recuperación de los concentrados de proteína.

Diversos autores han propuesto el uso de diferentes enzimas proteolíticas que permitan la digestión de las proteínas presentes en las macroalgas, entre las cuales destacan el uso de pepsina, tripsina, quimotripsina (Fleurence *et al.*, 1999); así como la degradación de la matriz extracelular de las macroalgas que permita la liberación de proteínas por medio de enzimas como celulasas, amilasas y glucanasas (Kadam *et al.*, 2015). En este sentido, la eliminación de los polisacáridos presentes en la harina de las macroalgas ayuda a incrementar la eficiencia de la concentración proteica. Sin embargo, debido a las diferencias en la composición de los polisacáridos dependiendo

de la especie de macroalga (celulosa, galactanos sulfatados, polisacáridos sulfatados, carragenanos, entre otros), esto deriva en que pudieran ser necesarios diferentes métodos de extracción.

Se ha visto que los métodos convencionales de obtención de proteínas (en las cuales se utilizan enzimas proteolíticas) requieren procesos largos, uso de volúmenes grandes de solventes y además la eficiencia obtenida es baja. Por esta razón, se han evaluado nuevos protocolos que permitan mejorar la obtención de concentrados proteicos mediante alternativas que incluyen el uso combinado de técnicas convencionales con tratamientos térmicos, ultrasonido o microondas (Kadam *et al.*, 2017; Lian y Fan 2013; Omont *et al.*, 2019).

En el caso del trabajo reportado por Kadam *et al.*, (2017), se observó una recuperación de hasta el 59% de proteínas totales durante la extracción proteica de la macroalga parda *Ascophyllum nodosum*, utilizando ultrasonido en combinación con ácido clorhídrico lo cual permitió la eliminación de complejos de polisacáridos e hidróxido de sodio que ayudó en la solubilización de proteínas. Omont *et al.* (2019) evaluaron la extracción de *Ulva lactuca*, *Eisenia sp* y *Porphyra sp* utilizando ácido clorhídrico en combinación con temperatura alta (60°C) durante 24 horas, y posteriormente fue incluido en la dieta de *L. vannamei* al 5, 10 y 15%, resultando en un mayor crecimiento de los camarones alimentados con los extractos de macroalgas comparados con el control. Por otra parte, se logró incrementar el contenido de proteína en los extractos comparado con la harina de macroalga, pasando de 15% a 33.2% para *Ulva lactuca*, de 15% a 30% con *Porphyra sp* y de 9% a 28% para *Eisenia sp*.

De igual manera, se han evaluado concentrados de proteína proveniente de *U. lactuca* obtenida por medio de una acidificación con ácido clorhídrico, con tratamiento térmico a 80-90°C durante 10 minutos y separado por filtración, demostrando que el extracto de macroalgas puede reemplazar hasta en un 30% la harina de soya de las formulaciones del camarón *Penaeus monodon* (Serrano y Santizo, 2015) y del 15% en tilapia *Oreochromis niloticus* (Serrano y Aquino, 2014).

No obstante, a pesar de los diferentes estudios que se han realizado para la optimización en la obtención de concentrados proteicos de macroalgas, su uso ha sido poco evaluado en alimentos acuícolas. Los concentrados de proteína de macroalgas tienen buen potencial para sustituir la harina de pescado en los alimentos, sin embargo, es necesario mejorar los procesos a escalas mayores, y combinarse con la obtención de otros compuestos de alto valor nutracéutico (Emblemsvåg *et al.*, 2020).

3. Conclusiones

Las macroalgas representan una fuente abundante y valiosa de nutrientes. Los procesos de valorización de las macroalgas como la fermentación y la producción de detritos unicelulares, mejora el valor nutricional y aumenta considerablemente la capacidad de inclusión en los alimentos balanceados de peces y crustáceos (>10%), además de permitir un reemplazo parcial importante de microalgas en la dieta de diversos bivalvos (<50%). Por otro lado, los concentrados proteicos o extractos altos en proteína de macroalgas permiten un reemplazo parcial de harina de pescado en alimentos acuícolas, sin embargo, es necesario continuar con el desarrollo de procesos más eficientes que conlleven a una reducción en el costo de los mismos. Aunque se han demostrado avances significativos en la investigación sobre la valorización de macroalgas marinas como fuente de nutrientes para la industria acuícola, es necesario continuar con el estudio de estos recursos que coadyuven al desarrollo de la acuicultura sostenible.

Agradecimientos

Al equipo de trabajo del laboratorio de genómica y bioinformática del programa de acuicultura del CIBNOR. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por el financiamiento del proyecto PDCPN 2015-887.

4. Referencias bibliográficas

- An, B. N. T., & Anh, N. T. N. (2020). Co-culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red seaweed (*Gracilaria tenuistipitata*) under different feeding rates: effects on water quality, fish growth and feed efficiency. *Journal of Applied Phycology*, 32(3), 2031-2040.
- Angell, A. R., Paul, N. A., & de Nys, R. (2017). A comparison of protocols for isolating and concentrating protein from the green seaweed *Ulva ohnoi*. *Journal of Applied Phycology*, 29(2), 1011-1026.
- Alemañ, A. E., Robledo, D., & Hayashi, L. (2019). Development of seaweed cultivation in Latin America: current trends and future prospects. *Phycologia*, 58(5), 462-471.
- Aslamyah, S., & Karim, M. Y. (2017). Fermentation of seaweed flour with various fermenters to improve the quality of fish feed ingredients. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 16(1), 8-14.
- Austin, B. & Zhang, X. H. (2006). *Vibrio harveyi*: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2): 119-124.
- Carboni, S., Clegg, S. H. & Hughes, A. D. (2016). The use of biorefinery by-products and natural detritus as feed sources for oysters (*Crassostrea gigas*) juveniles. *Aquaculture*, 464: 392-398.
- Choi, Y. J., Lee, S. R., & Oh, J. W. (2014). Effects of dietary fermented seaweed and seaweed fusiforme on growth performance, carcass parameters and immunoglobulin concentration in broiler chicks. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(6), 862.
- Cian, R. E., Bacchetta, C., Rossi, A., Cazenave, J., & Drago, S. R. (2019). Red seaweed *Pyropia columbina* as antioxidant supplement in feed for cultured juvenile Pacú (*Piaractus mesopotamicus*). *Journal of Applied Phycology*, 31(2), 1455-1465.
- Cruz-Suárez, L. E., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M. G. y Ricque-Marie, D. (2008). A Review of the Effects of Macroalgae in Shrimp Feeds and in Co-Culture. En: Cruz Suárez L. E, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-López M. G., Villarreal-Cavazos D. A., Lazo J. P., Viana M. T. (eds) Avances en Nutrición Acuícola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola Nuevo León, México, pp 304-333
- Cruz-Suárez, L. E., León, A., Peña-Rodríguez, A., Rodríguez-Peña, G., Moll, B., & Ricque-Marie, D. (2010). Shrimp/*Ulva* co-culture: a sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture*, 301(1), 64-68.
- Dubey, A., & Sivaraman, J. (2021). Unravelling the antioxidant and anti-cancerous properties of the chemical constituents present in methanol extract of green algae *Chaetomorpha antennina*. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences*. Assiut.
- Elizondo-González, R., Quiroz-Guzmán, E., Escobedo-Fregoso, C., Magallón-Servín, P., & Peña-Rodríguez, A. (2018). Use of seaweed *Ulva lactuca* for water bioremediation and as feed additive for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *PeerJ*, 6, e4459.
- Emblemsvåg, J., Kvaldsheim, N. P., Halfdanarson, J., Koesling, M., Nystrand, B. T., Sunde, J., & Rebours, C. (2020). Strategic considerations for establishing a large-scale seaweed industry based on fish feed application: a Norwegian case study. *Journal of Applied Phycology*, 32(6), 4159-4169.
- Evans, F. D., & Critchley, A. T. (2014). Seaweeds for animal production use. *Journal of applied phycology*, 26(2),

891-899.

- FAO. 2021. Estadísticas de pesca y acuicultura. Producción mundial por origen de producción 1950-2019 (FishstatJ). In: FAO División de Pesca. Roma. Actualización 2021. www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/es
- Feinman, S. G., Martínez, A. U., Bowen, J. L. & Tlusty, M. F. (2017). Fine-scale transition to lower bacterial diversity and altered community composition precedes shell disease in laboratory-reared juvenile American lobster. *Diseases of Aquatic Organisms*, 124(1): 41-54.
- Felix, N., & Brindo, R. A. (2008). Fermented feed ingredients as fish meal replacer in aquafeed production. *Aquaculture Asia*, 13(2), 33-34.
- Felix, N. & Brindo, R. A. (2014a). Evaluation of raw and fermented seaweed, *Ulva lactuca* as feed ingredient in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 1(3): 199-204.
- Felix, N. & Brindo, R. A. (2014b). Substituting fish meal with fermented seaweed, *Kappaphycus alvarezii* in diets of juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies IJFAS*, 1(15): 261-265.
- Felix, S., & Pradeepa, P. (2012). Lactic acid fermentation of seaweed (*Ulva reticulata*) for preparing marine single cell detritus (MSCD). *Tamilnadu J. Veterinary and Animal Sciences*, 8(2), 76-81.
- Felix, S. & Pradeepa, P. (2011). Seaweed (*Ulva reticulata*) Based Fermented Marine Silage Feed Preparation under Controlled Conditions for *Penaeus monodon* Larval Development. *Journal of Marine Science: Research & Development*, 01(01): 1-3.
- Figueroa, V., Farfán, M., & Aguilera, J. M. (2021). Seaweeds as Novel Foods and Source of Culinary Flavors. *Food Reviews International*, 1-26.
- Fleurence, J., Chenard, E., & Luçon, M. (1999). Determination of the nutritional value of proteins obtained from *Ulva armoricana*. *Journal of Applied Phycology*, 11(3), 231-239.
- Fleurence, J. (1999). Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in food science & technology*, 10(1), 25-28.
- Fleurence, J., Le Coeur, C., Mabeau, S., Maurice, M., & Landrein, A. (1995). Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata*. *Journal of Applied Phycology*, 7(6), 577-582.
- Fleurence, J., Moránçais, M., & Dumay, J. (2018). Seaweed proteins. In *Proteins in food processing* (pp. 245-262). Woodhead Publishing.
- Francis, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199(3-4): 197-227.
- Gamboa-Delgado, J., Peña-Rodríguez, A., Ricque-Marie, D., & Cruz-Suárez, L. E. (2011). Assessment of nutrient allocation and metabolic turnover rate in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* co-fed live macroalgae *Ulva clathrata* and inert feed: dual stable isotope analysis. *Journal of Shellfish Research*, 30(3), 969-978.
- Hardjani, D. K., Suantika, G., & Aditiawati, P. (2017). Nutritional profile of red seaweed *Kappaphycus alvarezii* after fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* as a feed supplement for white shrimp *Litopenaeus vannamei*

- nutritional profile of fermented red seaweed. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(4), 1637-45.
- Harel, M., Clayton, D. & Bullis, R. A. (2007). Feed formulation for terrestrial and aquatic animals. US20070082008A1
- Hernández, J. C. S., & Murueta, J. H. C. (2009). Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 290(3-4), 190-195.
- Hui, Y., Tamez-Hidalgo, P., Cieplak, T., Satessa, G. D., Kot, W., Kjærulff, S., ... & Krych, L. (2021). Supplementation of a lacto-fermented rapeseed-seaweed blend promotes gut microbial-and gut immune-modulation in weaner piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12(1), 1-14.
- Ilias, N. N., Jamal, P., Jaswir, I., Sulaiman, S., Zainuddin, Z., & Azmi, A. S. (2015, January). Potentiality of selected seaweed for the production of nutritious fish feed using solid state fermentation. In *Journal of Engineering Science and Technology. Special issue on SOMCHE 2014 & RSCE 2014 Conference* (pp. 30-40).
- Jerez-Timaure, N., Sánchez-Hidalgo, M., Pulido, R., & Mendoza, J. (2021). Effect of Dietary Brown Seaweed (*Macrocystis pyrifera*) Additive on Meat Quality and Nutrient Composition of Fattening Pigs. *Foods*, 10(8), 1720.
- Kadam, S. U., Álvarez, C., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2015). Extraction of biomolecules from seaweeds. In *Seaweed sustainability* (pp. 243-269). Academic Press.
- Kadam, S. U., Álvarez, C., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2017). Extraction and characterization of protein from Irish brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Food Research International*, 99, 1021-1027.
- Katayama, M., Fukuda, T., Okamura, T., Suzuki, E., Tamura, K., Shimizu, Y., ... & Suzuki, K. (2011). Effect of dietary addition of seaweed and licorice on the immune performance of pigs. *Animal science journal*, 82(2), 274-281.
- Kumar, C. S., Ganesan, P., Suresh, P. V., & Bhaskar, N. (2008). Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 45(1), 1.
- Kumara, K. R. P. S. & Hettiarachchi, M. (2017). White faeces syndrome caused by *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio fluvialis* in shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius 1798)-multimodal strategy to control the syndrome in Sri Lankan grow-out ponds. *Asian Fisheries Science*, 30(4): 245-261.
- Mann, K. H. (1988). Production and use of detritus in various freshwater, estuarine, and coastal marine ecosystems. *Limnology and Oceanography*, 33, 910-930.
- Matshogo, T. B., Mnisi, C. M., & Mlambo, V. (2021). Effect of Pre-Treating Dietary Green Seaweed with Proteolytic and Fibrolytic Enzymes on Physiological and Meat Quality Parameters of Broiler Chickens. *Foods*, 10(8), 1862.
- Marinho-Soriano, E., Camara, M. R., Cabral, T. D. M., & Carneiro, M. A. D. A. (2007). Preliminary evaluation of the seaweed *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) as a partial substitute for the industrial feeds used in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming. *Aquaculture Research*, 38(2), 182-187.
- Michalak, I., & Chojnacka, K. (2015). Production of seaweed extracts by biological and chemical methods. *Marine algae extracts: processes, products, and applications*, 121-144.
- Nayar, S., & Bott, K. (2014). Current status of global cultivated seaweed production and markets. *World Aquaculture*, 45(2), 32-37.
- Nahar, S., Hossain, F., Feroza, B., & Halim, M. A. (2008). Production of glucoamylase by *Rhizopus sp.* in liquid culture. *Pak. J. Bot*, 40(4), 1693-1698.

- Nazarudin, M. F., Yusoff, F., Idrus, E. S., & Aliyu-Paiko, M. (2020). Brown seaweed *Sargassum polycystum* as dietary supplement exhibits prebiotic potentials in Asian sea bass *Lates calcarifer* fingerlings. *Aquaculture Reports*, 18, 100488.
- Nehal, N. (2014). Seaweed: a potential “superfood” unexplored and untapped. *International Journal of Agriculture and Food Science Technology*, 5(6), 631-642.
- Ngo, T. T. T. (2019). Evaluating the effects of single cell detritus from red seaweed (*Gracillaria tenuistipitata*) and gutweed (*Enteromorpha sp.*) on growth of *Artemia franciscana*. *Can Tho University Journal of Science*, 11(1), 78-86.
- Ogello, E. O., Munguti, J. M., Sakakura, Y., & Hagiwara, A. (2014). Complete replacement of fish meal in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) grow-out with alternative protein sources. A review. <https://repository.maseno.ac.ke/handle/123456789/2280>.
- Omont, A., Quiroz-Guzman, E., Tovar-Ramirez, D., & Peña-Rodríguez, A. (2019). Effect of diets supplemented with different seaweed extracts on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Phycology*, 31(2), 1433-1442.
- Omont, A., Elizondo-González, R., Escobedo-Fregoso, C., Tovar-Ramírez, D., Hinojosa-Baltazar, P., & Peña-Rodríguez, A. (2021a). Bacterial communities and digestive enzymatic activities of *Litopenaeus vannamei* shrimp fed pre-digested seaweeds as a functional ingredient. *Journal of Applied Phycology*, 33(2), 1239-1251.
- Omont, A., Py, C., Gamboa-Delgado, J., Nolasco-Soria, H., Spanopoulos-Zarco, M., & Peña-Rodríguez, A. (2021b). Nutritional contribution of seaweed *Ulva lactuca* single-cell detritus and microalgae *Chaetoceros calcitrans* to the growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 541, 736835.
- Pal, A., Kamthania, M. C., & Kumar, A. (2014). Bioactive compounds and properties of seaweeds—a review. *Open Access Library Journal*, 1(4), 1-17.
- Peña-Rodríguez, A., Elizondo-González, R., Nieto-López, M. G., Ricque-Marie, D., & Cruz-Suárez, L. E. (2017). Practical diets for the sustainable production of brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis*, juveniles in presence of the green macroalga *Ulva clathrata* as natural food. *Journal of Applied Phycology*, 29(1), 413-421.
- Peña-Rodríguez, A., Morales-Alvarado, G., Elizondo-González, R., Mendoza-Carrión, G., Tovar-Ramírez, D., Escobedo-Fregoso, C. (2020). Seaweed single cell detritus effects on the digestive enzymes activity and microbiota of the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 3481-3493.
- Pereira, R., Valente, L. M., Sousa-Pinto, I., & Rema, P. (2012). Apparent nutrient digestibility of seaweeds by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Algal Research*, 1(1), 77-82.
- Pérez Camacho, A., Salinas, JM., Delgado, M. & Fuertes, C. (2007). Use of single cell detritus (SCD) produced from *Laminaria saccharina* in the feeding of the clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 266(1-4): 211-218.
- Pérez Camacho, A., Salinas, JM., Fuertes, C. & Delgado, M. (2004). Preparation of single cell detritus from *Laminaria saccharina* as a hatchery diet for bivalve mollusks. *Marine Biotechnology*, 6(6): 642-649.
- Portillo-Clark, G., Casillas-Hernández, R., Servín-Villegas, R., & Magallón-Barajas, F. J. (2012). Growth and survival of the juvenile yellowleg shrimp *Farfantepenaeus californiensis* cohabiting with the green feather alga *Caulerpa*

- sertularioides* at different temperatures. *Aquaculture Research*, 44(1), 22-30.
- Prachyakij, P., Charernjiratrakul, W., & Kantachote, D. (2008). Improvement in the quality of a fermented seaweed beverage using an antiyeast starter of *Lactobacillus plantarum* DW3 and partial sterilization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1713-1720.
- Ragan M. A., & Glombitza, K. W. (1986). Phlorotannins, brown algal polyphenols. In F. E. Round, & D. J. Chapman, Progress in phycological research (Vol. 4, pp. 130±230). Bristol: Biopress Ltd.
- Rajauria, G., & Yuan, Y. V. (2021). Algae: A Functional Food with a Rich History and Future Superfood. *Recent Advances in Micro and Macroalgal Processing: Food and Health Perspectives*, 1-13.
- Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charernjiratrakul, W., Penjamras, P., & Chaiyasut, C. (2011). Enhancement of γ -aminobutyric acid in a fermented red seaweed beverage by starter culture *Lactobacillus plantarum* DW12. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(3), 1-1.
- Rato, A., Joaquim, S., Tavares, T. G., Martins, Z. E., Guedes, A. C., Pereira, L. F., ... & Matias, D. (2018). Viability of dietary substitution of live microalgae with dry *Ulva rigida* in broodstock conditioning of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Biology open*, 7(9), bio035923.
- Reboleira, J., Silva, S., Chatzifragkou, A., Niranjana, K., & Lemos, M. F. (2021). Seaweed fermentation within the fields of food and natural products. *Trends in Food Science & Technology*.
- Refstie, S., Sahlström, S., Bråthen, E., Baeverfjord, G., & Krogedal, P. (2005). Lactic acid fermentation eliminates indigestible carbohydrates and antinutritional factors in soybean meal for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 246(1-4), 331-345.
- Rodríguez-González, H., Orduña-Rojas, J., Villalobos-Medina, J. P., García-Ulloa, M., Polanco-Torres, A., López-Álvarez, E. S., ... & Hernández-Llamas, A. (2014). Partial inclusion of *Ulva lactuca* and *Gracilaria parvispora* meal in balanced diets for white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of applied phycology*, 26(6), 2453-2459.
- Santizo, R. B., Serrano Jr, A. E., & Corre, V. L. (2014). Proximate composition and dry matter digestibility of *Ulva lactuca* in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *ABAH Bioflux*, 6(1), 75-83.
- Santoso, S. I., Suprijatna, E., Setiadi, A., & Susanti, S. (2016). Effect of duck diet supplemented with fermented seaweed wastes on carcass characteristics and production efficiency of indigenous Indonesian ducks. *Indian Journal of Animal Research*, 50(5), 699-704.
- Salgado, C. L., Muñoz, R., Blanco, A., & Lienqueo, M. E. (2021). Valorization and upgrading of the nutritional value of seaweed and seaweed waste using the marine fungi *Paradendryphiella salina* to produce mycoprotein. *Algal Research*, 53, 102135.
- Schleder, D. D., Blank, M., Peruch, L. G. B., Poli, M. A., Goncalves, P., Rosa, K. V., ... & Hayashi, L. (2020). Impact of combinations of brown seaweeds on shrimp gut microbiota and response to thermal shock and white spot disease. *Aquaculture*, 519, 734779.
- Schleder, D. D., Peruch, L. G. B., Poli, M. A., Ferreira, T. H., Silva, C. P., Andreatta, E. R., ... & do Nascimento Vieira, F. (2018). Effect of brown seaweeds on Pacific white shrimp growth performance, gut morphology, digestive enzymes activity and resistance to white spot virus. *Aquaculture*, 495, 359-365.

- Serrano Jr, A. E., & Aquino, J. I. (2014). Protein concentrate of *Ulva intestinalis* (Chlorophyta, Ulvaceae) could replace soybean meal in the diet of *Oreochromis niloticus* fry. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 7(4), 255-262.
- Serrano Jr, A. E., Santizo, R. B., & Tumbokon, B. L. M. (2015). Potential use of the sea lettuce *Ulva lactuca* replacing soybean meal in the diet of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* juvenile. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation-International Journal of the Bioflux Society (AAFL Bioflux)*, 8(3).
- Soler-Vila, A., Coughlan, S., Guiry, M. D., & Kraan, S. (2009). The red alga *Porphyra dioica* as a fish-feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on growth, feed efficiency, and carcass composition. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 617-624.
- Tan, S. H., Mailer, R. J., Blanchard, C. L., & Agboola, S. O. (2011). Canola proteins for human consumption: extraction, profile, and functional properties. *Journal of food science*, 76(1), R16-R28.
- Tanyaros, S., & Chuseingjaw, S. (2016). A partial substitution of microalgae with single cell detritus produced from seaweed (*Porphyra haitanensis*) for the nursery culture of tropical oyster (*Crassostrea belcheri*). *Aquaculture Research*, 47(7), 2080-2088.
- Teles, F. B., Assef, A. N. B., Andrade, R. M., Soares, V. V. M., AWdS, A., Lima-Junior, R. C. P., ... & Wilke, D. V. (2021). Sulfated polysaccharides from red seaweed *Gracilaria cornea* induce macrophages polarization to an antitumor M1 phenotype.
- Uchida, M. (1996). Formation of single cell detritus densely covered with bacteria during experimental degradation of *Laminaria japonica* thalli. *Fisheries science*, 62(5), 731-736.
- Uchida, M., Nakata, K. & Maeda, M. (1997). Introduction of detrital food webs into an aquaculture system by supplying single cell algal detritus produced from *Laminaria japonica* as a hatchery diet for *Anemia* nauplii. *Aquaculture*, 154(2): 125-137.
- Uchida, M. & Numaguchi, K. (1998). Method for preparing algal detritus. US005801050A
- Uchida, M., Amakasu, H., Satoh, Y. & Murata, M. (2004). Combinations of lactic acid bacteria and yeast suitable for preparation of marine silage. *Fisheries Science*, 70(3): 507-517.
- Uchida, M., & Murata, M. (2002). Fermentative preparation of single cell detritus from seaweed, *Undaria pinnatifida*, suitable as a replacement hatchery diet for unicellular algae. *Aquaculture*, 207(3-4), 345-357.
- Uchida, M., Kurushima, H., Ishihara, K., Murata, Y., Touhata, K., Ishida, N., ... & Araki, T. (2017). Characterization of fermented seaweed sauce prepared from nori (*Pyropia yezoensis*). *Journal of bioscience and bioengineering*, 123(3), 327-332.
- Uchida, M., Kurushima, H., Hideshima, N., Araki, T., Ishihara, K., Murata, Y., ... & Ishida, N. (2018). Preparation and characterization of fermented seaweed sauce manufactured from low-quality nori (dried and fresh fronds of *Pyropia yezoensis*). *Fisheries science*, 84(3), 589-596.
- Valente, L. M. P., Gouveia, A., Rema, P., Matos, J., Gomes, E. F., & Pinto, I. S. (2006). Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 252(1), 85-91.
- Watanabe, T. (2002). Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries Science*, 68(2), 242-252.

- Wong, K. H., & Cheung, P. C. (2001). Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds Part II. In vitro protein digestibility and amino acid profiles of protein concentrates. *Food chemistry*, 72(1), 11-17.
- Yang, H., Li, Z. B., Chen, Q., Li, W. J., Sun, Y. Z., & Lu, J. (2016). Effect of fermented *Enteromopha prolifera* on the growth performance, digestive enzyme activities and serum non-specific immunity of red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 47(12), 4024-4031.
- Yang, Q., Zhou, X., Zhou, Q., Tan, B., Chi, S., & Dong, X. (2009). Apparent digestibility of selected feed ingredients for white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. *Aquaculture Research*, 41(1), 78-86.
- Yin, X. W., Min, W. W., Lin, H. J., & Chen, W. (2013). Population dynamics, protein content, and lipid composition of *Brachionus plicatilis* fed artificial macroalgal detritus and *Nannochloropsis sp.* diets. *Aquaculture*, 380, 62-69.
- Zhou, L., Chen, C., Xie, J., Xu, C., Zhao, Q., Qin, JG., Chen, L. & Li, E. (2019). Intestinal bacterial signatures of the “cotton shrimp-like” disease explain the change of growth performance and immune responses in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology*, 92(May): 629-636.

Respuesta Antioxidante y del Sistema Inmune de Machos Reproductores de *Litopenaeus vannamei* Boone (1931) Alimentados con Dietas Suplementadas con Vitamina E

Grecia Montalvo, Sarahi Campos, Martín Arenas, Alvaro Barreto, Karla Escalante¹, Gerard Cuzon, Gabriela Gaxiola.

Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) Sisal. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de México (UNAM). México.

E-mail: greciamontalvofernandez@gmail.com

Resumen

La adición de suplementos vitamínicos a la dieta podría controlar el síndrome de melanización de las gónadas. Un alimento balanceado con alta calidad nutricional se empleó como dieta control (149 mg/kg) y se prepararon dietas de tratamiento con 3 niveles de vitamina E: 894 mg/kg (dieta A), 1639 mg/kg (dieta B) y 2384 mg/kg (dieta C). Se instalaron tres tanques de 500 L para cada tratamiento y se colocaron siete individuos en cada tanque. La cantidad y calidad de los espermatozoides fueron cuantificados y clasificado como células normales, anormales o muertas. Se cuantificó el colesterol, triglicéridos, glucosa, proteína total en la hemolinfa y la actividad de Profenoloxidasa (ProFO) y de enzimas antioxidante: Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (Gpx) en el aparato reproductor. Además, se cuantificó la expresión diferencial de genes del sistema inmune y los genes que codifican para las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y Gpx) en el aparato reproductor. La cantidad y calidad de esperma fue mayor en los camarones alimentados con la dieta A. La adición de vitamina E a la dieta A, condujo a una disminución del colesterol y triglicéridos. La peroxidación lipídica y la expresión diferencial de genes del sistema inmune también fueron menor en la dieta A, lo que sugiere que esta dieta contribuye a un buen estado fisiológico, donde la activación del sistema inmunológico y los genes que codifican las enzimas antioxidantes no son necesarios. Sin embargo, con el aumento de vitamina E en las dietas B y C, el contenido de triglicéridos y la peroxidación lipídica aumentó en la hemolinfa. Los machos alimentados con las dietas B y C presentaron una alta actividad de las enzimas antioxidantes y poca cantidad de esperma, lo que sugiere un estado de estrés oxidativo. Por lo tanto, la dieta basal A suplementada con 894 mg/kg de vitamina E es recomendado para el cultivo de machos reproductores de *L. vannamei*.

Palabras clave: camarón, inmune, calidad espermática, estrés oxidativo, vitamina E.

1. Introducción

Durante el proceso de cultivo de camarón, uno de los obstáculos para tener machos reproductores de calidad, que aseguren altas tasas de fertilización, es la melanización del aparato reproductor. Este proceso es inducido por el estrés oxidativo y puede provocar la disminución de espermatozoides viables y esterilidad (Parnes *et al.*, 2006). Los agentes oxidantes son producidos de manera natural por el metabolismo celular en procesos básicos como la respiración, la ovogénesis y la espermatogénesis (Hargreaves, 1998). Es por esto que se hace necesario controlar el estrés oxidativo para evitar afectaciones en la capacidad reproductiva.

La inclusión de vitaminas en la dieta de camarones puede ser una estrategia útil para controlar los radicales libres por su alta capacidad antioxidante. Se conoce que las vitaminas desempeñan funciones en la maduración sexual de vertebrados e invertebrados y que participan en varios procesos como la espermatogénesis y la protección de las membranas biológicas de la peroxidación de lípidos (Pérez-Velázquez *et al.*, 2003).

Desde la década de los 70, la investigación en nutrición de camarón se centró en identificación de compuestos estimulantes de la maduración, el desarrollo de dietas y los requerimientos de lípidos y vitaminas fundamentalmente la A, C y E. Sin embargo, los requerimientos de vitaminas para los reproductores en muchas especies de camarón aún no se han definido, porque las dietas artificiales para reproductores generalmente se complementan con una mezcla completa de vitaminas (Wouters *et al.*, 2001).

Para lograr una reproducción exitosa de los camarones peneidos es igualmente importante la calidad reproductiva de machos y hembras, sin embargo, se ha prestado mucha atención a los efectos de la dieta en el desarrollo de las hembras (Cahu *et al.*, 1991; Cahu *et al.*, 1995; Wouters *et al.*, 1999b; Wouters *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018; Arshadi *et al.*, 2020) mientras los estudios de machos reproductores son más escasos (Leung-Trujillo and Lawrence, 1988).

En uno de los pocos estudios en los que se ha explorado la nutrición de los reproductores machos se pudo comprobar que los machos de *Litopenaeus setiferus* L alimentados con una dieta deficiente en vitamina E tenían un porcentaje significativamente menor de espermatozoides normales, en comparación con los camarones alimentados con una dieta que contenía vitamina E (Chamberlain 1988).

En otro estudio con la especie *Marsupenaeus japonicus* Bate se probaron dietas que contenían 0, 500, 1.000 y 1.500 mg de L-ascorbil-2-fosfato de magnesio (APMY), un derivado hidrosoluble de

la vitamina C y se evaluó las respuestas en crecimiento, supervivencia y el índice gonadosomático (peso de la gónada como porcentaje del peso total del cuerpo). Los individuos alimentados con dietas que contenían 500, 1.000 y 1500 mg/kg de APMY produjeron un crecimiento y una supervivencia favorables. El índice gonadosomático de los machos alimentados con la dieta con 1500 mg / kg de APM Y fue significativamente mayor que los de los camarones alimentados con 0 y 500 mg/kg. (Alava *et al.*, 1993).

En un trabajo reciente realizado con machos de *Panaeus monodon* Fabricius se estudió el efecto de diferentes concentraciones vitamina E (200, 600 y 1000 mg / kg) sobre la regeneración y calidad del espermátforo que se evaluaron mediante el peso del espermátforo, el recuento de espermatozoides y las tasas de ausencia de espermátforo. El peso del espermátforo, la cantidad de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides normales fue superior en individuos alimentados con dietas suplementadas con vitamina E con respecto a la dieta control ($p < .05$), pero no hubo diferencias significativas entre los individuos sometidos a las dietas suplementadas. El número total de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides vivos disminuyó con el aumento de vitamina E (600 y 1000 mg/kg). Los autores concluyeron que 200 mg /kg de vitamina E en el alimento podría promover eficazmente la regeneración del espermátforo y mejorar la cantidad de espermatozoides de *Panaeus monodon* (Jiang *et al.*, 2020).

En el caso particular de *Litopenaeus vannamei* Boone (1931) un estudio realizado con machos reproductores demostró que una dieta típica de maduración de alimento fresco (60% calamar, 40% de poliqueto *Glycera dibranchiata*) provocó pérdida de peso en los individuos y disminuyó el conteo total de espermatozoides, por lo que los autores concluyeron que la dieta de maduración no es nutricionalmente óptima para machos reproductores (Chamberlain y Lawrence, 1981).

Pérez-Velázquez *et al.* (2003) realizaron un estudio donde se probaron diferentes dietas, eliminando de manera selectiva algunos componentes de la dieta basal de maduración, como la mezcla de vitaminas, colesterol, fosfolípidos y Astaxantina. Evaluaron su efecto sobre la calidad reproductiva en machos reproductores de *L. vannamei*. Sus resultados demostraron que la cantidad de esperma de camarones alimentados con la dieta control (la cual contenía mezcla de vitaminas) fue significativamente mayor que la de los camarones alimentados con la dieta sin vitaminas (4.6 ± 3.2 million sperm cell y $- 1.7 \pm 2.6$ million sperm cells respectivamente). Aunque este estudio no fue diseñado para evaluar el efecto de ninguna vitamina en particular, sí permitió demostrar que

las vitaminas juegan un papel importante en la capacidad reproductiva de machos de *L. vannamei* (Leung-Trujillo and Lawrence 1988).

En un estudio más específico se estudiaron los efectos de la eliminación de las vitaminas liposolubles individuales (A, D, E y K) de las dietas semipurificadas sobre el crecimiento y la supervivencia de *Litopenaeus vannamei*. Los tratamientos incluyeron una dieta control suplementada con vitaminas A, D₃, E y K₃ y dietas donde se excluyeron de manera individual cada uno de estas vitaminas. El mejor crecimiento (aumento de peso de 7283%) se observó en camarones alimentados con una dieta control con suplementos de las vitaminas. Se produjo un crecimiento significativamente menor en camarones alimentados con dietas deficientes en vitamina A (6242%), D₃ (5588%) y E (4821%). Los camarones alimentados con una dieta sin suplemento de vitamina E tuvieron significativamente la supervivencia más baja. La mayoría de los camarones alimentados con la dieta sin vitamina E suplementaria exhibieron un oscurecimiento del hepatopáncrea que no se observó en los otros tratamientos (Haiqui *et al.*, 1992).

Para *L. vannamei* se han sugerido requerimientos óptimos de vitamina E. Akiyama *et al.* (1992) propusieron 300 mg/kg para la formulación de dietas comerciales, estas estimaciones se realizaron basándose en cambios en los parámetros de crecimiento. Posteriormente He & Lawrence (1993b) evaluaron dietas purificadas con diferentes cantidades de vitamina E y basándose en el incremento del peso corporal, propusieron un requerimiento óptimo de 99 mg/kg de vitamina E. Sin embargo; no existen estudios que propongan una cantidad de vitamina E óptima, para esta especie, basándose en la calidad espermática, lo cual es de vital importancia para lograr una buena capacidad reproductiva de la especie en condiciones de cultivo.

Para evaluar el estrés oxidativo en camarones usualmente se mide la concentración de lípidos y otros metabolitos en la hemolinfa, la actividad de enzimas antioxidantes como: Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Glutation peroxidasa (Gpx) que ayudan a controlar las especies reactivas de oxígeno. Además, el sistema inmune se activa en condiciones de estrés, por lo que, la expresión diferencial de los genes del sistema inmune también ayuda a conocer el estado fisiológico de los individuos. Algunos de los genes del sistema inmune de camarones son: alpha2 macroglobulina (a2M), hemocianina (Hc), peneidina (Pen), profenoloxidasa (proFO). La estimación de todos estos parámetros nos permite explicar los resultados referentes a la calidad espermática.

Teniendo en cuenta la capacidad antioxidante de la vitamina E y su importancia en la espermatogénesis de camarones, nos planteamos la siguiente hipótesis: si se alimentan individuos machos reproductores de *L. vannamei* con una dieta suplementada con diferentes cantidades de vitamina E, se debe lograr una mayor cantidad y calidad espermática comparado con individuos alimentados con una dieta sin el suplemento vitamínico. En este escenario podemos predecir una disminución del estrés oxidativo, expresado como una disminución de lípidos en la hemolinfa, disminución de la actividad de enzimas antioxidantes, una baja expresión diferencial de los genes del sistema inmune, así como de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes en individuos alimentados con dietas suplementadas con vitamina E. Para someter a prueba esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos: 1) Determinar la cantidad y calidad espermática en individuos alimentados con diferentes concentraciones de vitamina E, 2) determinar la concentración de triglicéridos, colesterol, profenoloxidasa y proteínas totales en la hemolinfa, 3) cuantificar la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y Gpx) en el aparato reproductor, 4) Determinar la expresión diferencial de los genes del sistema inmune ($\alpha 2M$, Hc, Pen y ProFO) y los genes que codifican para las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y Gpx) en el aparato reproductor.

2. Materiales y Métodos

Material experimental

Los camarones empleados se obtuvieron en el área de cría larvaria en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal (Facultad de Ciencias de la UNAM). Se emplearon tanques rectangulares de 1.50 m de largo, por 50 cm de ancho y 1 m de profundidad, con el fondo cóncavo, de fibra de vidrio revestidos de blanco con un volumen de 400 litros y una capacidad para sembrar 20,000 organismos por tanque. Se mantuvo la temperatura entre 28- 30°C y un fotoperiodo (12 h luz: 12 h oscuridad). Los tanques de cultivo se llenaron con agua de mar previamente filtrada utilizando filtro de 10 y 5 micras. Se añadió al agua EDTA (10mg/L) para tener una salinidad de cultivo de 36 ppm. Aunque los nauplios se alimentan de sus reservas nutricionales se le adicionó una pequeña porción de microalgas (*Chetoceros ceratosporum* y *Tetraselmis chuii*). Se realizó el recambio de agua de 50% en los estadios de Mysis (MI, MII, MIII). En el estadio de postlarva (PL5) se realizó el recambio de agua de un 60%. Posteriormente las postlarvas se pasaron al área de engorda para la etapa de crecimiento hasta ser adulto reproductores.

Condiciones de crecimiento

Los animales en el área de engorda se mantuvieron en dos tanques con revestimiento circular de geomembrana (20 000 litros, 1 m de profundidad) en un sistema de biofloc con aireación constante, sin recambio de agua. La temperatura del agua 27 °C y la salinidad al 35%. Diariamente se tomaron los parámetros de la calidad del agua (oxígeno disuelto, pH y temperatura) tres veces al día. Los animales se alimentaron con una dieta comercial tres veces al día (9:20 am, 4:05 y 8:05 pm). Una vez a la semana se realizó la medición de nitrato, nitrito y amonio en los tanques. Previo al montaje del experimento los animales se pasaron a un área de aclimatación en un sistema de recirculación de agua clara, diluyendo el biofloc gradualmente, donde permanecieron de 3 a 4 días. Posteriormente se procedió al sexado de los animales en tinas de 50 L, para separar los machos reproductores que se emplearon en el experimento.

Dietas implementadas

Se utilizó como control positivo una dieta basal (G. Gax) reconocida para el cultivo de camarón (Tabla 1) la cual contiene 149 mg/kg de vitamina E. Se prepararon tres dietas a partir de la dieta basal con diferentes inclusiones de vitamina E: dieta A (894 mg/kg), dieta B (1639 mg/kg) y dieta C (2384 mg/kg). Se prepararon 3 kg de cada una. El procedimiento se realizó mezclando las diferentes harinas y luego se le añadieron los ingredientes líquidos. Posteriormente se mezclaron las diferentes cantidades de aglutinantes con agua para luego ser unido con la masa que contiene los ingredientes y mezclarlo durante 20 minutos. Se añadió 1 L de agua y se terminó de mezclar. Posteriormente se pasó la masa por una moledora y al final se puso a secar en un horno a 60°C durante 8 horas.

Tabla 1. Composition and proximate analysis of experimental diets.

<i>Ingredientes</i> (% peso seco)	Basal	A	B	C
Harina de sardina ^a	40.45	40.45	40.45	40.45
Harina de calamar ^a	4.6	4.6	4.6	4.6
Harina de trigo ^b	18	17.9	17.8	17.7
Suero de leche	12	12	12	12
Concentrado de proteína de soja	10	10	10	10
Levadura de cerveza	5	5	5	5
Aceite de pescado ^a	4	4	4	4
Aceite de soya	2	2	2	2
Mezcla de aminoácidos ^d	2.35	2.35	2.35	2.35
Rovimix [®] Premix ^c	0.1	0.1	0.1	0.1
Rovimix [®] vit E ^{®e}	0	0.1	0.2	0.3
Alginato de sodio	1.5	1.5	1.5	1.5
<i>Análisis aproximado % DW</i>				
humedad	6.27	8.57	8.26	8.33
proteínas	42.5	42.5	42.5	42.5
lípidos	11.61	11.24	11.79	11.03
ceniza	14.28	14.30	14.43	14.54
carbohidratos	23.5	23.5	23.5	23.5
energía bruta kJ g ⁻¹	18	18	18	18

^aProteínas Marinas y Agropecuarias S.A. de C.V. Jalisco, MX. ^bCasa Santos Lugo S.A. de C.V. Mérida, MX.

^dLYS+LEU+OHproline. ^eDMS Nutritional Products México S.A. de C. V.

Diseño experimental

Para el experimento se emplearon camarones con un peso promedio de 19.7 g. Se evaluaron 4 tratamientos (dieta basal, dieta A, dieta B y dieta C) detalladas en el acápite anterior. Se dispusieron tres tanques de 500L para cada tratamiento, considerados como la unidad experimental y siete individuos por cada tanque, distribuidos aleatoriamente. Se utilizó un sistema de recirculación de agua clara. A partir del cuarto día, se comenzó a contar de manera oficial cada registro. Se

monitorearon los parámetros de oxígeno y temperatura y se les cambiaba el agua de manera diaria para evitar que los desechos eleven los niveles de amonio y disminuyan los niveles de oxígeno. Los animales se mantuvieron un mes con las diferentes dietas.

Muestreo

Un mes después de exponer a los individuos a las dietas se procedió a realizar el muestreo para lo cual se seleccionaron al azar 4 individuos de cada tanque y se tomaron muestras de hemolinfa y aparato reproductor. Se realizó la biometría de los animales para determinar el peso promedio. La hemolinfa se recogió del seno ventral en una jeringa de 30 G × 13 mm precargada con anticoagulante de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en una solución isotónica de camarones (SIC-EDTA) (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, Hepes 10 mM, EDTA Na₂ 10 mM, pH 7.3) y se empleó para determinar los metabolitos. Se utilizó un espermátforo para determinar la calidad espermática, del resto del aparato reproductor una parte se conservó a -80 ° C para determinar la actividad de las enzimas antioxidantes y otra parte en 600 µL de una solución RNA later a -80 ° C para la determinación de la expresión diferencial de los genes del sistema inmune y las enzimas antioxidantes.

Calidad espermática

Para el estudio de la calidad espermática se extrajo un espermátforo de manera manual. Se colocó en un tubo de ensayo de 5 ml, previamente llenado con 2 ml de solución libre de calcio, y se procedió a liberar las células espermáticas macerando el tejido en un líquido homogenizador. De la solución resultante se extrajeron 900 µl y se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml, pasando la solución espermática por una malla de 90-110 micras. Después se añadió 100 µl de azul de tripan, y se dejó reposar de 15 a 20 minutos en refrigeración. Posteriormente se añadió una gota de la solución espermática que contiene el colorante a una cámara de Neubauer y se observó a través del microscopio con un aumento 40X. Las células espermáticas enfocadas se clasificaron en tres grupos: normales, anormales y muertas, esto con el objetivo de determinar la calidad espermática. Además, se contabilizó el número de células espermáticas en cada uno de los tratamientos.

Metabolitos en hemolinfa

Los metabolitos triglicéridos, colesterol y glucosa fueron medidos en hemolinfa, empleando un kit comercial para diagnóstico médico (Randox ©, Tlalnepantla, México) (Hernández-López, 2001; Martínez Porchas *et al.*, 2013). La solución de hemolinfa con anticoagulante se centrifugó a 800 g durante 3 min a 4 ° C y el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf®. La absorbancia de las muestras (10 µL) se registraron por triplicado en un lector de microplacas a 490 nm (Appliskan ©, Thermo Scientific, Inc., Waltham, MA), y las concentraciones se calcularon a partir de una solución de sustrato estándar. Se midió la proteína soluble total en hemolinfa, según Bradford (1976) adaptado a un método de microplaca usando 200 µL de un concentrado de reactivo colorante (Bio-Rad, Philadelphia, PA) y albúmina de suero bovino como estándar (EMD Biosciences, Inc., La Jolla, CA). La absorbancia de muestras (10 µL) se leyó por triplicado a 595 nm (Appliskan ©, Thermo Scientific, Inc., Waltham, MA).

Actividad de enzimas antioxidantes y estrés oxidativo

Se determinó la actividad enzimática de Superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) y Glutathion peroxidasa (Gpx, EC 1.11.1.9) en el aparato reproductor. Para la actividad de SOD se utilizó un kit comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Una unidad de superóxido dismutasa se definió como la cantidad de enzima requerida para inhibir la actividad de la xantina al 50% en 20 min. Para la actividad de la catalasa, se realizó una adaptación, en una microplaca usando la técnica reportada por Hadwan y Abed (2016), incubando 10 µL de enzima obtenida en muestras de hemolinfa en dos placas de 96 pocillos. Un volumen de 100 µL de tampón fosfato (pH 7,4) en una microplaca mientras que 100 µL del mismo tampón con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para la segunda microplaca. Se incubaron muestras en ambas microplacas durante 3 min y la reacción se detuvo mediante la adición de 100 µL de molibdato de amonio. En ambos casos, la absorbancia se midió por triplicado a 450 nm en un lector de microplacas (Beckman Coulter® Modelo DTX 880, Brea, CA). La actividad de la Glutathion peroxidasa fue medida por espectrofotometría como la tasa de reducción de NADPH a 340 nm (25 ° C) usando el protocolo de Plagia y Valentine (1967) modificada para microplacas de 96 pocillos. Se adicionó 15 µL de muestra diluida a 120 µL de buffer Tris-HCL (50mmol L⁻¹, pH= 7.6) que contenía 0.1 mmol L⁻¹ de EDTA, 0.14 mmol L⁻¹ de NADPH, 1 mmol L⁻¹ de glutatión y 1 U de glutatión reductas. La reacción se inició con la adición de 15 µL de t- butylhydroperóxido 0.2 mmol L⁻¹. La actividad de

glutación peroxidasa fue estimada utilizando el coeficiente de extinción molar de NADPH ($6.220 \text{ mol L}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y expresada en unidades internacionales ($\mu\text{mol NADPH consumido min}^{-1}$). Como parte del estrés oxidativo se determinó la peroxidación de lípidos (LPO) empleando una modificación para microplacas del método FOX. Este método se basa en la oxidación del reactivo Fe^{+2} a Fe^{+3} por agentes oxidantes de la muestra que luego se unen con el reactivo xilenol naranja (XO). Después de una hora de incubación se obtiene un complejo Fe^{+3} -XO, de color y se midió la absorbancia a los 560 nm. Para la cuantificación de los peróxidos de lípidos no se utilizó trifenilfosfina sino se realizó a través de una curva de calibración con concentraciones conocidas de hidroperóxido de terc-butilo (Banerjee *et al.*, 2003).

Extracción de RNA y síntesis de cDNA

El RNA total fue extraído a partir de 100 mg de aparato reproductor, preservado previamente en 600 μL de una solución de RNA later. Se empleó el protocolo de Trizol (TRIZOL®, Life Technologies, Carlsbad, CA) y se almacenó a -80°C . La concentración y pureza del RNA fue cuantificado midiendo la absorbancia a 260/280 nm con un espectofotómetro (Nanodrop) (ThermoScientific, Wilmington, DE). Solo las muestras con un valor de absorbancia superior a 1.8 fueron tomadas para los siguientes experimentos. Las muestras fueron tratadas con DNAsa libre de RNAsa para eliminar alguna posible contaminación con DNA en un volumen de reacción de 10 μL . La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 30 min, posteriormente se les añadió a las muestras 1 μL de EDTA y se incubaron a 65°C durante 10 min. El DNA complementario (cDNA) fue obtenido en un volumen de reacción de 20 μL . La reacción contenía: 1 μg de RNA total, 2 μL de $10\times$ reverse transcriptase (RT) buffer, 0.8 μL de 10 mM dNTP, 2 μL de $10\times$ RT Primers Random, 1 μL de U-reverse transcriptase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y 10.2 μL de agua libre de nucleasa. El programa de PCR tiene los siguientes pasos: 25°C durante 10 min, 37°C durante 120 min, 85°C durante 5 min y finalmente a 4°C termina la reacción.

Expresión diferencial de genes (RT-q PCR)

La expresión de los genes del sistema inmune: alpha2 macroglobulina ($\alpha 2\text{M}$), hemocianina (Hc), peneidina (Pen), profenoloxidasa PproFO) y los genes que codifican para las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y Gpx), fueron medidas por RT- q PCR. Se emplearon los *primers* específicos publicados para *L. vannamei* Aguilera *et al.*, 2018 (Tabla 2). OligoPerfect® software

(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Todos los *primers* fueron producidos por Sigma-Aldrich® (Toluca, México). Las reacciones de RT- q PCR se llevaron a cabo en un termociclador fluorométrico IQ5 (BIO-RAD®, Philadelphia, PA) empleando una mezcla de SYBR Green (Bio-Rad®, Philadelphia, PA). Las reacciones de amplificación se realizaron en placas de 96 pocillos y en un volumen de reacción de 15 µL la cual contenía: 7.5 µL de super mix SYBR Green (Bio-Rad®, Philadelphia, PA), 0.5 µL de cada primer específico (forward y reverse), 4,5 µL de agua libre de pirógenos y 2 µL de cDNA. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C durante 3 min seguido por 35 ciclos de 95 °C durante 30 s y 60 °C durante 30 s. Cada muestra fue corrida en triplicado con el gen de la β actina como control interno (GenBank # AF300705) (Wang, Chang, & Chen, 2007). Para cada *primer* se incluyó un control negativo sin cDNA. Después de la amplificación de PCR se realizó un análisis de la curva Melt para corroborar que solo hubo un producto de amplificación. La expresión relativa de cada gen analizado se calculó a partir de la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, donde C_t es el valor correspondiente al número de ciclo en el que la fluorescencia fue generada (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para amplificar genes del sistema inmune y enzimas antioxidantes en *L. vannamei*

Gen	Secuencia		Tamaño pb
	foward	reverse	
<i>β-Actin</i>	5'-TGTGTGACGACGAAGTAGCC-3'	5'-TGGTCGTGAAGGTGTAACCA- 3'	142
A2M	-GTTTCCATCACCGCCTCA-3'	5'-ACCTTATCCTGCGGTGCCA- 3'	227
ProFO	5'-ACCGTACAAGGAAGAGGAAC-3'	5'-TCTCGCAGGTCGTTGTTGAT- 3'	222
Hc	5'- GTCTTAGTGGTTCTTGGGCTTGTC-3'	5'- GGTCTCCGTCCTGAATGTCTCC-3'	124
Pen3a	5'-CTGGTCTTCTTGCCTCCTT-3'	5'-ATATCCCTTTCCACGTGAC- 3'	121
SOD	5'-AGCTTACATCTCCATCCTGG-3'	5'-ATCTGAGGACTGACTGTGC-3'	189
CAT	5'-ACTCCCATTTGCTGTTTCGT-3'	5'-ATCCCAATTTCTTCTTCTG-3'	195
Gpx	5'-AGTCGATGTCAACGGGTCAAC-3'	5'-GCTGAACCTCTTAAACGGCTG- 3'	180

Statistical analysis

Todo el análisis de datos estadísticos y la visualización gráfica se realizaron en el software R 4.0.2 (R Core Team 2021). Usamos la prueba de razón de verosimilitud y los criterios de información de Akaike para seleccionar el modelo parsimonioso óptimo con la variable predictora más informativa. Para la validación del modelo, inspeccionamos el trazado de los residuos de Pearson frente a cada variable explicativa, frente a los valores ajustados y los datos observados frente a los valores ajustados. La significancia se asignó a $p < 0,05$. Cuando se observaron diferencias significativas, se realizaron pruebas post hoc con un ajuste de Tukey de la biblioteca emmeans (Lenth 2021).

Cantidad de esperma.

Ajustamos un modelo mixto binomial negativo con el paquete lme4 (Bates *et al.*, 2015). Los datos del recuento de espermatozoides se modelaron en función del tratamiento (basal, A, B y C) y la

calidad del esperma (normal, anormal y muerto). El modelo incluyó Tanque y organismo como efectos aleatorios. El método utilizado para la estimación de los parámetros fue de máxima verosimilitud y los valores p se calcularon utilizando la aproximación de Wald.

Enzimas antioxidantes y genes del sistema inmune

Ajustamos un modelo de mínimos cuadrados generalizados con el paquete nlme (Pinheiro *et al.*, 2021). Los datos de la actividad enzimática se modelaron en función del tratamiento. Por otro lado, los datos de expresión diferencial de los genes del sistema inmune se transformaron en base diez logarítmica y el modelo incluyó una variación de estructura por nivel de tratamiento. El método utilizado para la estimación de parámetros fue de máxima verosimilitud.

3. Resultados

Calidad espermática

La cantidad total de esperma fue mayor en los individuos alimentados con la dieta A (1463.61×10^4 células / mL), superando la cantidad de esperma en la dieta basal (1375.16×10^4 células / mL) aunque no hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Sin embargo; al aumentar la cantidad de vitamina E en las dietas B y C hubo una disminución considerable de la cantidad de esperma ($417.08.46 \times 10^4$ células / mL y 455.81×10^4 células / mL respectivamente) (Figura 1-A).

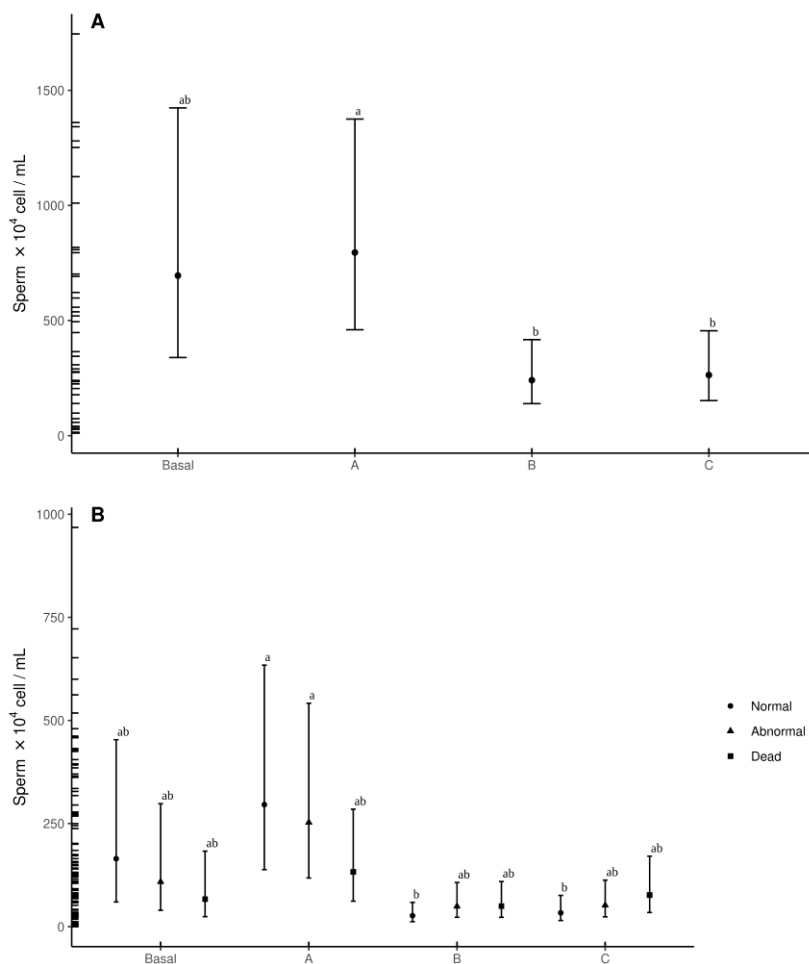


Fig. 1. Cantidad (A) y calidad espermática (B) de machos reproductores de *Litopenaeus vannamei* sometidos a dietas suplementadas con diferentes cantidades de vitamina E: dieta A (894 mg/kg), dieta B (1639 mg/kg) y dieta C (2384 mg/kg). Valor de significancia $p < 0.05$.

En cuanto a la calidad espermática encontramos un patrón similar. El número de células espermáticas normales fue superior en los individuos de la dieta A (634×10^4 células / mL) comparado con la dieta basal (453.3×10^4 células / mL) y al aumentar la cantidad de vitamina E hubo una disminución de células espermáticas normales en las dietas B y C (58.9×10^4 y 75.8×10^4 células / mL respectivamente) (Figura.1-B).

Metabolitos en la hemolinfa

La cantidad de triglicéridos en la dieta A (0.31 ± 0.01) fue menor con respecto a la dieta basal (0.35 ± 0.01), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). La concentración de triglicéridos fue significativamente mayor en los individuos alimentados con la dieta C (0.42 ± 0.02 mg / mL) con respecto a los de la dieta B (0.25 ± 0.06 mg / mL) (Figura 2-C). Los metabolitos colesterol, glucosa y ProFo no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Figuras 2 A, B y D). Las proteínas totales en hemolinfa no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Figura 3).

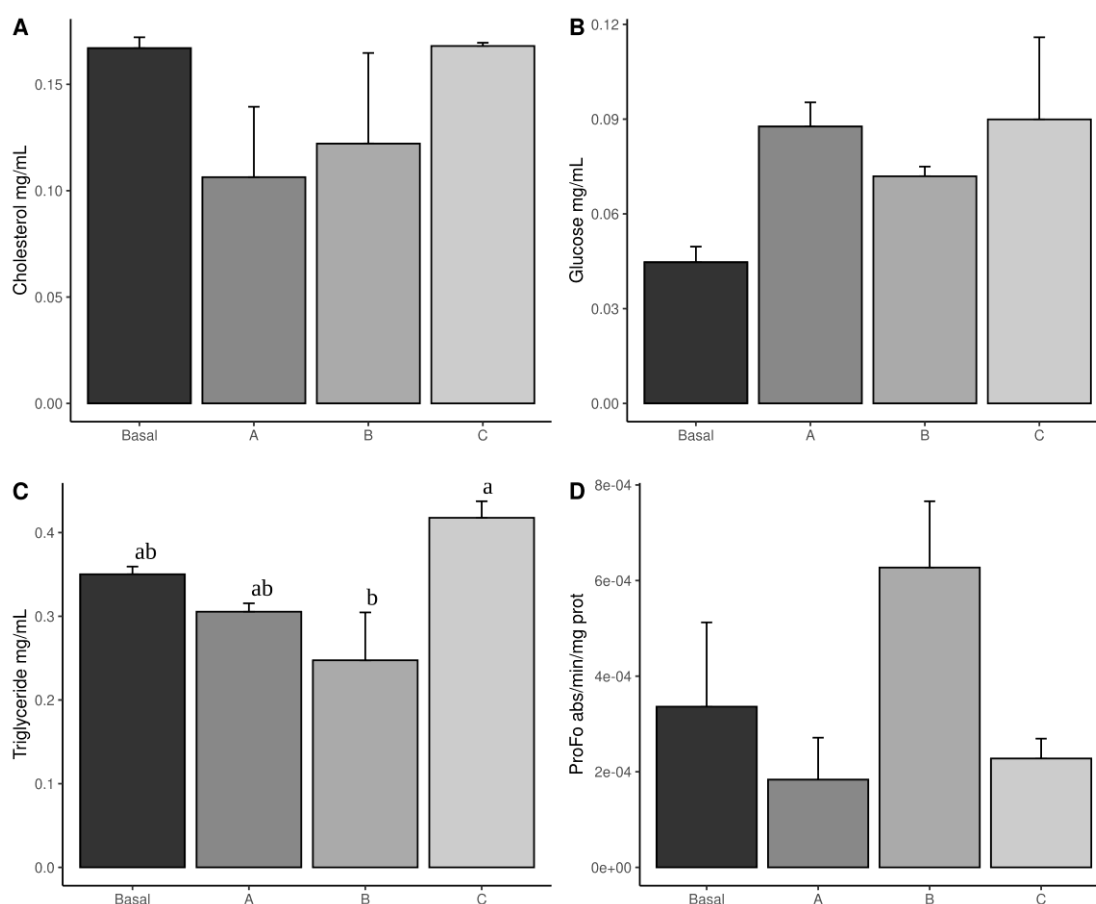


Fig. 2.

Concentración de metabolitos en hemolinfa de machos reproductores de *Litopenaeus vannamei* alimentados con dietas suplementadas con diferentes cantidades de vitamina E: dieta A (894 mg/kg), dieta B (1639 mg/kg) y dieta C (2384 mg/kg). Valor de significancia $p < 0.05$.

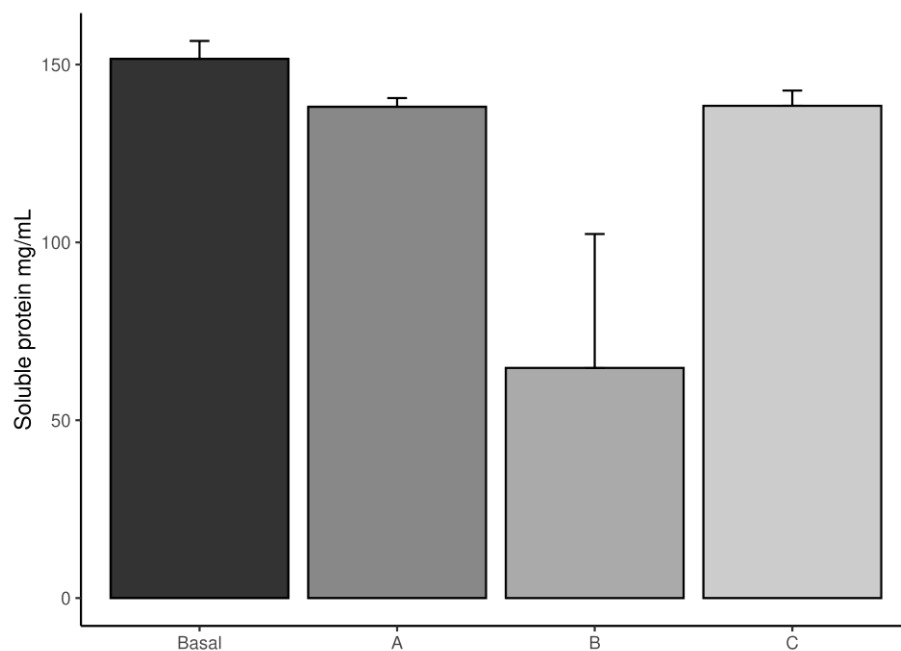


Fig. 3. Concentración de proteínas solubles totales en hemolinfa de machos reproductores de *Litopenaeus vannamei* alimentados con dietas suplementadas con diferentes cantidades de vitamina E: dieta A (894 mg/kg), dieta B (1639 mg/kg) y dieta C (2384 mg/kg). Valor de significancia $p < 0.05$.

Actividad enzimas antioxidantes y estrés oxidativo

La mayor actividad de la SOD se obtuvo en individuos alimentados con la dieta C (10.7973 U/mg of prot), aunque no presentó diferencias significativas con los alimentados con la dieta B (9.5316) ($p < 0,05$). La menor actividad de esta enzima se encontró en individuos alimentados con las dietas basal y dieta A (6.5585 y 6.4416 U/mg of prot respectivamente) (Figura 4-A). La actividad de la enzima CAT no mostró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Figura 4-B). En cuanto a la actividad de la Glutación peroxidasa solo se encontraron diferencias significativas con los individuos alimentados con la dieta A (8.5576) ($p < 0,05$) los cuáles presentaron los menores valores de actividad enzimática (Figura 4-C). La peroxidación de lípidos (LPO) fue superior en los individuos alimentados con la dieta C (90.7009 nMol peróxido/mL) y se observó una ligera disminución de peroxidación lipídica en individuos alimentados con la dieta A (82.5032 nMol

peróxido/mL) con respecto a los alimentados con la dieta basal (87.8833 nMol peróxido/mL), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 4-D).

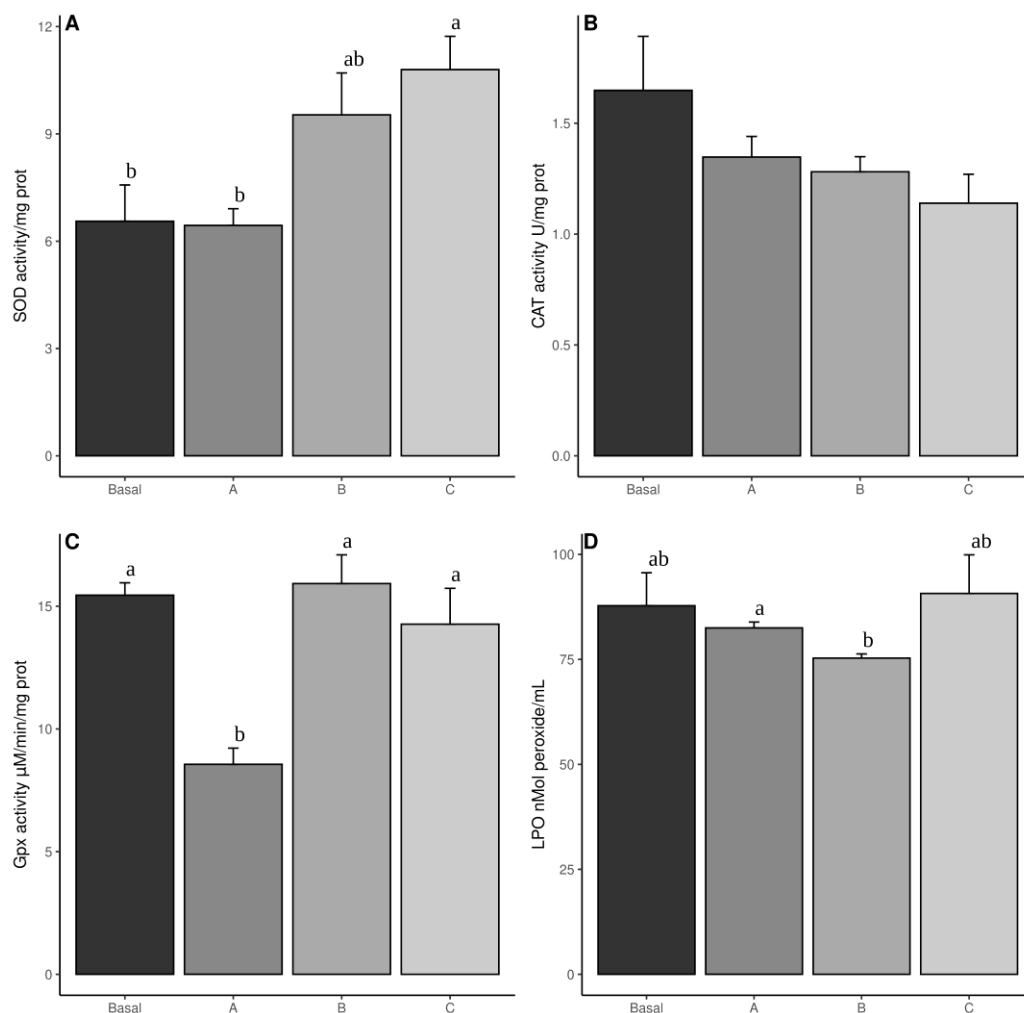


Fig. 4. Actividad de

enzimas antioxidantes y peroxidación de lípidos en aparato reproductor de individuos machos reproductores de *Litopenaeus vannamei* alimentados con dietas suplementadas con diferentes cantidades de vitamina E: dieta A (894 mg/kg), dieta B (1639 mg/kg) y dieta C (2384 mg/kg). Valor de significancia $p < 0.05$.

Análisis de la expresión relativa de genes del sistema inmune y enzimas antioxidantes.

Se encontró un patrón consistente donde la expresión relativa de los genes del sistema inmune analizados es menor en individuos alimentados con la dieta A (A2M, 0.0786; Pen, 0.0587; Hc, 0.2714; ProFo, 0.0471) con respecto a la dieta basal (A2M, 0.1261; Pen, 0.3173; Hc, 27.3728; ProFo, 0.0550), aunque no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$). La expresión relativa

de los genes A2M, Pen y proFo (0.4620; 1.2434; 1.0732 respectivamente) en individuos sometidos a la dieta C fue superior con respecto a los demás tratamientos (Figuras 5- A, C y D).

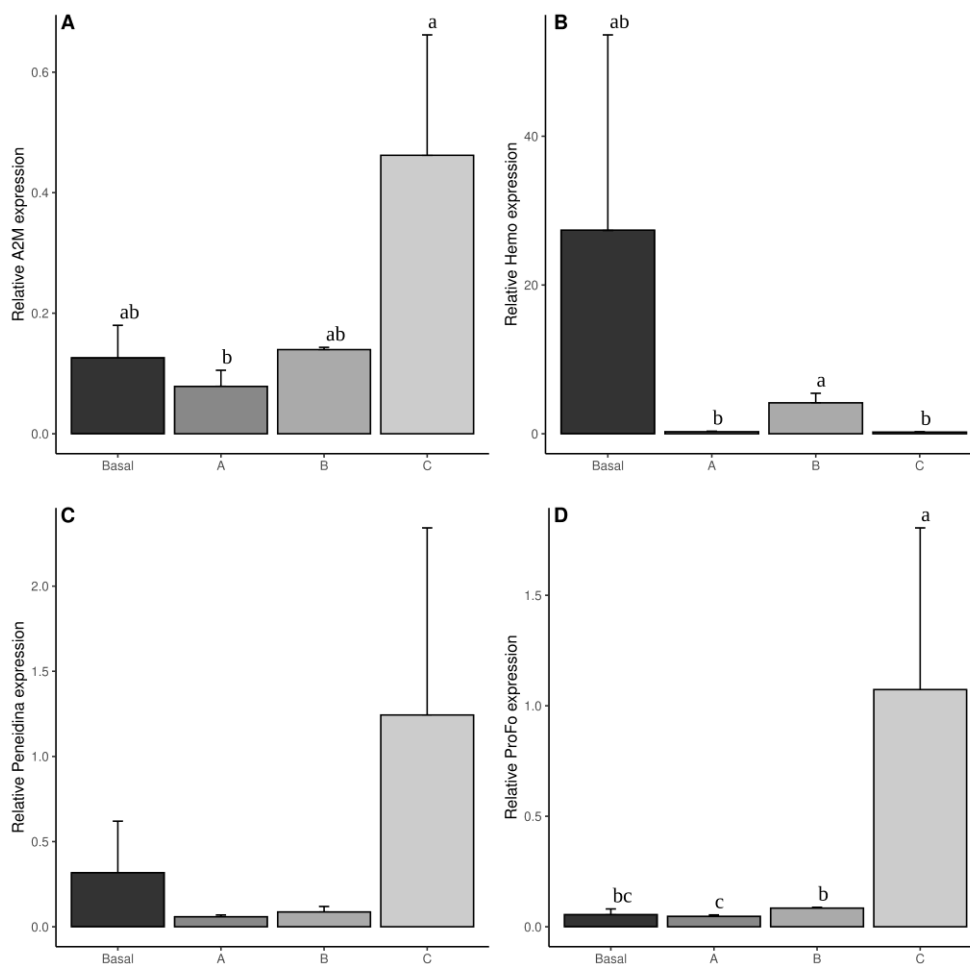


Fig. 5. Expresión relativa de los genes del sistema inmune en aparato reproductor de individuos machos reproductores de *Litopenaeus vannamei* alimentados con dietas suplementadas con diferentes concentraciones de vitamina E: dieta A (894 mg/kg), dieta B (1639 mg/kg) y dieta C (2384 mg/kg). Valor de significancia $p < 0.05$.

Para las tres enzimas antioxidantes, la expresión relativa fue menor en los individuos alimentados con la dieta basal (SOD, 0.0668; CAT, 0.3866; Gpx, 0.2083) seguido de los individuos alimentados con la dieta A (SOD, 0.0191; CAT, 1.0323; Gpx, 1.2319), aunque no mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). La mayor expresión relativa fue en los individuos alimentados con la dieta C (SOD, 3.5557; CAT, 2.6400; Gpx 1.9072) (Figura 6).

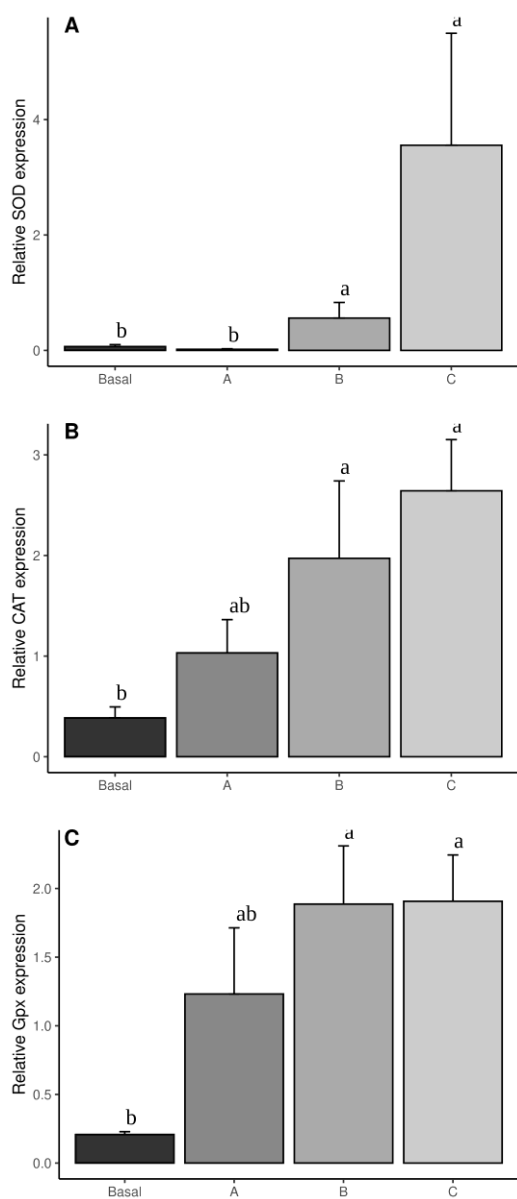


Fig. 6. Expresión relativa de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes (SOD, CAT, Gpx) en aparato reproductor de individuos machos reproductores de *Litopenaeus vannamei* alimentados con dietas suplementadas con diferentes concentraciones de vitamina E: dieta A (894 mg/kg), dieta B (1639 mg/kg) y dieta C (2384 mg/kg). Valor de significancia $p < 0.05$.

4. Discusión

Los resultados de nuestro estudio indican que los individuos alimentados con la dieta A, conformada por la dieta basal suplementada con 894 mg/kg de vitamina E, fueron los que mostraron una mayor cantidad y calidad espermática superando a la dieta basal, la cual no tiene vitamina E adicional, aunque no se mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Nuestro resultado concuerda con lo reportado en un estudio con machos reproductores de *Litopenaeus setiferus* alimentados con una dieta deficiente en vitamina E donde se encontró que estos individuos tenían un porcentaje significativamente menor de espermatozoides normales, en comparación con los camarones alimentados con una dieta que contenía vitamina E (Chamberlain, 1988).

Otro ejemplo que coincide con nuestros resultados es el estudio realizado con machos de la especie *Panaeus monodon* donde los autores encontraron que al emplear vitamina E en la dieta en una concentración de 200 mg/kg se observó un incremento del peso del espermatóforo, la cantidad de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides normales comparado con individuos alimentados con una dieta sin el suplemento de vitamina E (Jiang *et al.*, 2020).

Un resultado que concuerda con lo obtenido en nuestro trabajo es un estudio realizado con *Litopenaeus vannamei* donde evaluaron la influencia de la eliminación selectiva de algunos componentes de la dieta basal de maduración y los autores observaron que la cantidad de espermatozoides de camarones alimentados con la dieta control (la cual contenía mezcla de vitaminas, incluyendo la vitamina E) fue significativamente mayor que la de los camarones alimentados con la dieta sin vitaminas (4.6 ± 3.2 million sperm cell y 1.7 ± 2.6 million sperm cells respectivamente) (Leung-Trujillo and Lawrence 1988).

Los resultados de nuestro trabajo y las demás investigaciones mencionadas anteriormente pueden deberse a la capacidad antioxidante que tiene la vitamina E que logró controlar el estrés oxidativo, atenuando así los efectos negativos que tiene la oxidación sobre la calidad espermática.

Para explicar el control del estrés oxidativo en camarones alimentados con la dieta A comparado con la dieta basal analicemos los parámetros metabólicos, bioquímicos y moleculares estudiados. Los niveles de colesterol, triglicéridos y ProFo en hemolinfa disminuyeron en los individuos alimentados con la dieta A comparados con aquellos sometidos a la dieta basal, aunque solo hubo diferencias significativas para los triglicéridos ($p < 0.05$) (Figura 2).

Las enzimas antioxidantes son inducibles por lo que una disminución en los niveles de colesterol y triglicéridos sugiere menos radicales libres y en ese caso, cabe esperarse que haya una menor actividad de enzimas antioxidantes. Esto se corrobora en nuestro estudio ya que en el aparato reproductor de individuos alimentados con la dieta A se obtuvieron menores valores de actividad enzimática para SOD, CAT y Gpx, comparado con los individuos alimentados con la dieta basal, aunque solo para la glutathion peroxidasa hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (Figura 4).

Este resultado coincide con un estudio realizado con *Litopenaeus vannamei* donde evaluaron los efectos de dos concentraciones de vitamina E (100 y 300 mg/kg) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y Gpx. Los resultados indicaron que la actividad más baja de las tres enzimas antioxidantes se obtuvo en individuos alimentados con la dieta suplementada con 300 mg/kg de vitamina E (He *et al.*, 1993). Esto sugiere que con esta concentración de vitamina E se logra un estado fisiológico adecuado donde debe haber pocos radicales libres en la hemolinfa.

Además, la expresión relativa del gen que codifica para SOD es menor en individuos alimentados con la dieta A comparado con la dieta basal, lo que indica que hubo una menor transcripción de ese gen en el aparato reproductor, posiblemente, ante un estado fisiológico con pocos radicales libres. Los valores de expresión relativa de los genes que codifican para CAT y Gpx en aparato reproductor de individuos alimentados con la dieta A son numéricamente superiores a los obtenidos en individuos con la dieta basal, aunque no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$). (Figura 5).

La peroxidación lipídica también fue menor en los individuos de la dieta A en comparación con los individuos alimentados con la dieta basal, aunque no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$). Este proceso metabólico trae consigo afectaciones, ya que los radicales libres interactúan con los electrones libres de los lípidos que están en las membranas celulares desestabilizándolas. Los agentes antioxidantes son capaces de atrapar los radicales libres e impedir que se unan a los lípidos de las membranas ayudando a la terminación de la reacción de peroxidación (Marnett, 1999). Se conoce que las membranas mitocondriales de las células musculares y del hepatopáncrea de *Litopenaeus vannamei* son más susceptibles a la peroxidación de los ácidos grasos cuando la dieta es deficiente en vitaminas (He & Lawrence, 1993).

Si analizamos la expresión relativa de los genes del sistema inmune evaluados en nuestro estudio (A2M, Hc, Pen y ProFo) podemos ver que en todos los casos los transcritos de estos genes en el

aparato reproductor es menor en individuos alimentados con la dieta A con respecto a los individuos alimentados con la dieta basal. Esto sugiere que la dieta A contribuye a que los individuos tengan un buen estado fisiológico donde no es necesario la activación del sistema inmune. Sin embargo, en la dieta C donde hay indicios de estrés oxidativo (mayor cantidad de triglicéridos, mayor actividad de enzimas antioxidantes, mayor peroxidación de lípidos) hubo una mayor expresión de los transcritos de A2M, Pen y ProFo.

Es claro en nuestros resultados que hay un valor óptimo de vitamina E (894 mg/kg) que garantiza el control del estrés oxidativo y permite una mayor calidad espermática y por encima de este valor se obtiene un efecto contrario.

Por otra parte en nuestro estudio también encontramos que en las dietas B (suplementada con 1639 mg/kg de vitamina E) y dieta C (suplementada con 2384 mg/kg de vitamina E) el incremento en la cantidad de vitamina E tuvo un efecto contrario observándose una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de la cantidad y la calidad del espermatozoide lo cual sugiere que el efecto antioxidante de la vitamina E está regulado por ciertos límites, por lo que es un error pensar que siempre que se adicione más vitamina E se obtendrá una mayor calidad espermática.

Un resultado similar se obtuvo en un estudio realizado con la especie *Panaeus monodon* donde emplearon tres concentraciones de vitamina E (200, 600 y 1000 mg/kg) y se observó que la cantidad de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides normales fue superior en individuos alimentados con 200 mg/kg de vitamina E con respecto a la dieta control ($p < 0.05$). Sin embargo; estas variables disminuyeron cuando se aumentó la concentración de vitamina E a 600 y 1000 mg/kg (Jiang *et al.*, 2020). Los autores consideraron estas concentraciones como un exceso de vitamina E para sus condiciones experimentales.

El exceso de vitamina también se ha reportado en un estudio realizado con individuos juveniles y adultos de la especie *Artemesia Ionginaris* Bate (Penaeidae) donde se observó una menor tasa de crecimiento corporal, supervivencia y además afectaciones histológicas del hepatopáncrea en los animales alimentados con una dieta suplementada con 3000 mg/kg de vitamina E. Los autores consideraron que era una cantidad excesiva y establecieron el nivel óptimo de vitamina E para *Artemesia Ionginaris* en 1500 mg/kg (Fernández, 2002).

Para explicar la disminución de la calidad espermática en las dietas B y C a partir de nuestros datos experimentales podemos decir que hubo un incremento de los triglicéridos en la hemolinfa fundamentalmente en individuos de la dieta C ($p < 0.05$) al igual que de colesterol, aunque con éste

último no hubo diferencias significativas con las demás dietas. Además, en la dieta B se obtuvieron los mayores valores de profenoloxidasa (ProFo) (figura 2). Las dietas B y C presentaron los mayores valores en la actividad de SOD que es una enzima inducible que actúa cuando hay altas concentraciones de radicales libres. La Gpx también tuvo una gran actividad en individuos alimentados con las dietas B y C (casi el doble de la actividad de individuos alimentados con la dieta A) lo cual indica la presencia de peróxidos en la hemolinfa (Figura 4).

Si analizamos la expresión de los genes del sistema inmune podemos ver que en los individuos alimentados con la dieta C todos los genes mostraron una mayor expresión relativa excepto hemocianina, esto apunta a una condición fisiológica desfavorable (figura 5). La expresión relativa de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y Gpx) es mucho mayor en individuos de las dietas B y C (figura 6) lo cual sugiere que fisiológicamente se está estimulando la ruta de transcripción de estos genes para la síntesis de proteínas antioxidantes. Esto suele suceder ante un escenario de estrés oxidativo y posiblemente es lo que haya causado una disminución de la cantidad y calidad espermática en individuos alimentados con las dietas B y C (figura 1).

Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan una valiosa información para la reformulación y la optimización de las dietas utilizadas para machos reproductores de *L. vannamei*. Nos permitirá además proponer una cantidad de vitamina E óptima para machos reproductores basada en la cantidad y calidad espermática en condiciones de cultivo.

5. Conclusiones

El empleo de la dieta A compuesta por el alimento basal (G. Gax) suplementado con 894 mg/kg de vitamina E favoreció la cantidad y la calidad espermática de machos reproductores de *L. vannamei* comparada con individuos alimentados con la dieta basal sin suplemento vitamínico. El incremento de la calidad espermática estuvo asociado a la disminución de triglicéridos en la hemolinfa. Además, menor actividad de enzimas antioxidantes y expresión de los genes del sistema inmune en el aparato reproductor. Todo esto apunta a que los individuos sometidos a esta dieta tenían un estado fisiológico favorable.

Contrariamente, la cantidad y calidad espermática disminuyó considerablemente cuando las cantidades de vitamina E se incrementaron en las dietas B (1639 mg/kg de vitamina E) y C (2384 mg/kg de vitamina E). La disminución de la calidad espermática estuvo relacionada con un

incremento en los triglicéridos en la hemolinfa, incremento de las enzimas antioxidantes como SOD, CAT y Gpx y además un incremento de los transcritos de los genes del sistema inmune (A2M, Pen y ProFo) en el aparato reproductor sugiriendo una condición fisiológica de estrés oxidativo.

Existe un valor óptimo de vitamina E con el cuál se puede controlar el estrés oxidativo y mejorar la cantidad y calidad espermática. Sin embargo, con cantidades de vitamina E superiores se obtiene una disminución de la cantidad y calidad espermática.

Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan una valiosa información para la reformulación y la optimización de las dietas utilizadas para machos reproductores de *L. vannamei* en cultivo. Sugerimos la dieta basal G. Gax suplementada con 894 mg/kg de vitamina E con el objetivo de controlar el estrés oxidativo y una mayor protección del aparato reproductor para lograr una buena cantidad y calidad espermática.

Referencias

- Aguilera-Rivera D, Prieto-Davó A, Rodríguez-Fuentes G, Escalante-Herrera K, Hernández-López J, Chávez-Sánchez C, Rodríguez-Canul R, Gaxiola G*. 2018. Immune response of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* previously reared in biofloc and after an infection assay with *Vibrio harveyi*. Journal of World Aquaculture Society (DOI: 10.1111/jwas.12543).
- Braga A, Lopes D, Magalhães V, Klosterhoff MC, Romano LA, Poersch LH, Wasielesky W. 2018b. Hemocytic melanization in shrimp spermatophores. Aquaculture 486:64-67.
- Braga, A., Lopes, D. L., Magalhaes, V., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2015). Use of biofloc technology during the pre-maturation period of *Litopenaeus vannamei* males: effect of feeds with different protein levels on the spermatophore and sperm quality. Aquaculture research, 46(8), 1965-1973.
- Cahu, C., Fakhfakh, M., Quazuguel, P., 1991. Effect of dietary α -tocopherol level on reproduction of *Penaeus indicus*. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. Eds., LARVI '91—Fish and Crustacean Ž. Larviculture Symposium, Special Publication, vol. 15, European Aquaculture Society, Gent, Belgium, pp. 242–244.
- Cahu, C.L., Cuzan, G., Quazuguel, P., 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids, α -tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. Comp. Biochem. Physiol. 112 3–4, 417–424.
- Chamberlain, G.W., 1988. Stepwise investigation of environmental and nutritional requirements for reproduction of penaeid shrimp. Ph.D. Thesis, Department of Wildlife and Fisheries Sciences, Texas A & M University, USA.
- Chamberlain G.W. and Lawrence A.L., 1981. Maturation, reproduction and growth of *P. vannamei* and *P.stylirostris* fed natural diets. Journal of the World Aquaculture Society, 12:209-224.
- Chen,H. 1983. Recent advances in nutrition of *Penaeus monodon*. Journal of the World Aquaculture Society, 24: 231-240.
- Dibyajyoti Banerjee, U.K. Madhusoodanan, M. Sharanabasappa, Sandip Ghosh, Jose Jacob. 2003. Measurement of plasma hydroperoxide concentration by FOX-1 assay in conjunction with triphenylphosphine. Clinica Chimica Acta 337, 147 – 152
- Fennuci, Jorge Lino y Analía Fernández Jiménez. 2004. Acción de las vitaminas en las dietas de camarones penaeoideos. Avances en nutrición acuícola. Memorias del VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo. Sonora. Mexico.
- Fernández Gimenez, A. V. 2002. Requerimiento de vitaminas liposolubles A y E en la dieta del camarón *Artemesia longinaris* Bate, 1888 y el langostino *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888). Web https://repositoriosdigitales.mincyt.gob.ar/vufind/Record/BDUBAFCEN_5f892a442f313e83f3b18e6719b242de/Cite
- Haiqi He, Addison L.Lawrence, RuiyuLiu. 1992. Evaluation of dietary essentiality of fat-soluble vitamins, A, D, E and K for penaeid shrimp (*Penaeus vannamei*). [Aquaculture, Volume 103, Issue 2](#), 1. Pages 177-185.
- Hargreaves, J.A. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. En: Aquaculture 166, pags. 181-212. DOI: 10.1016/s0044-8486(98)00298-1.
- He.H. & Lawrence.A.L. 1993b. Vitamin E requirement of *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 118: 245-255.

- He.H. 8. Lawrence.A.L. 1994. Effects of dietary vitamins A and O3 on growth and survival of *Penaeus vannamei*. Book of Abstracts World Aquaculture'94; New Orleans, Louisiana, USA, 112.
- He.H.; Lawrence,A.L. 8. Liu,R. 1992. Evaluation of dietary essentiality of fat-soluble vitamins, A, D, E and K for penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 103: 177-185.
- Jiang, S., Liu, D., Zhou, F., (...), Yang, L., Jiang, S. 2020. Effect of vitamin E on spermatophore regeneration and quality of pond-reared, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture Research*. 51(6), pp. 2197-2204.
- Kanazawa,A. 1985. Nutrition of penaeid prawn and shrimp. In: Taki,Y.; Primavera,L.H. and Lobrera,J.A. (eds.). Proceedings of the First International Conference on Culture of Penaeid prawn/Shrimp Aquacult. Dept. Southeast Asian Fish. Dev. Center. Iloilo,Philippines, 123-130.
- Leung-Trujillo, J. R. and A. L. Lawrence. 1988. The effect of ascorbic acid on sperm and spermatophore quality in *Penaeus vannamei* males fed prepared diets. *Journal of the World Aquaculture Society* 19:46^a
- Leung-Trujillo, J., Lawrence, A.L., 1988. The effect of ascorbic acid on sperm and spermatophore quality in *Penaeus vannamei* males fed prepared diets. *J. World Aquac. Soc.* 19, 46 A.
- Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Marnett LJ. *Mutation research* 1999 Mar 8;424(1-2):83-95.
- Parnes, S; S. Raviv; A. Shechter; A. Sagi. 2006. Males also have their time of the month; Cycle disposal of old spermatophores, timed by the molt cycle, in the marine shrimp. *J. exp. Biol.* 209: 4984-4983.
- Pascual C, Sánchez A, Zenteno E, Cuzon G, Gxiola G, Brito R, Gelabert R, Hidalgo E, Rosas C. 2006. Biochemical, Physiological and Immunological changes during, starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultura* 251, 416-429.
- Pérez J. 2005. Fisiología y calidad reproductiva de machos de camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en condiciones de cautiverio (Tesis para Doctor en Ciencias). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz, México
- Perez-Velazquez M, González-Félix ML, Lawrence AL, Bray WA, Gatlin III DM. 2003. Dietary effects on sperm quality of *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Journal World Aquaculture Society* 34:92-98.
- Rodríguez, J., Cedeño, R., Molina, C., Otero, V., Valenzuela, E., Sotomayor, M.A., 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei*. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y CiveraCerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22. Mérida.
- Roeland Wouters, Patrick Lavens, Julia Nieto, Patrick Sorgeloos. 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture*. 202(1-2):1-21.
- Roeland Wouters, Patrick Lavens, Julia Nieto, Patrick Sorgeloos. 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture* 202, 1–21.
- Tacon,A.G.J. 1987. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp-A training manual. 1- The essential nutrients. FAO support to the Regional Aquaculture Activities for Latin America and the Caribbean Project GCP/RLA/O75/ITA. Brasilia, Brasil, 208pp.
- Wouters, R., Gómez, L., Lavens, P., Calderón, J., 1999. Feeding enriched *Artemia* biomass to *Penaeus vannamei* broodstock: its effect on reproductive performance and larval quality. *J. Shellfish Res.* 18 (2), 651–656.

- Wouters, R., Molina, C., Lavens, P., Calderon, J., 1999b. Contenido de lípidos y vitaminas en reproductores silvestres durante la maduración ovarica y en nauplios de *Penaeus vannamei*. Proceedings of the Fifth Ecuadorian Aquaculture Conference, Guayaquil, Ecuador, Fundación CENAIM-ESPOL, CDROM.
- Arshadi, A., Gharaei, A., Mirdar Harijani, J. 2020. Effect of dietary vitamin E on reproductive performance and vitellogenin gene expression in broodstock of *Litopenaeus vannamei*. Iranian Journal of Fisheries Sciences . 19(5), pp. 2475-2492.
- Li, Y., Fan, B., Huang, Y., (...), Zhang, M., Zhao, Y. 2018. Effects of dietary vitamin E on reproductive performance and antioxidant capacity of *Macrobrachium nipponense* female shrimp. Aquaculture Nutrition. 24(6), pp. 1698-1708
- Nguyen, B.T., Koshio, S., Sakiyama, K., (...), Ishikawa, M., Yokoyama, S. 2012. Effects of dietary vitamins C and E and their interactions on reproductive performance, larval quality and tissue vitamin contents in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Bate Aquaculture 334-337, pp. 73-81
- Wouters, R., Molina, C., Lavens, P., Calderón, J. 2001. Aquaculture Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stages of sexual maturation Open Access 198(3-4), pp. 307-323.

Mini-review: Development of High-throughput Omics Resources for Aquaculture Nutrition

Omar Mendoza-Porras, Simone A. Osborne, Nicholas Wade

CSIRO Agriculture and Food, Queensland Bioscience Precinct, St Lucia, QLD, 4067 Australia,

Corresponding author: Ph. +617 3214 2466, omar.mendozaporras@csiro.au

Abstract

Enhanced growth, immunity, and resilience are highly sought-after phenotypic traits in aquaculture. In current practice, feeds are purposefully formulated to include ingredients that promote these traits while striving for low production costs, complying with sustainability, and more recently, social license. The use of omics technologies in aquaculture has significantly increased in the last decade with transcriptomics being the most commonly employed tool to infer animal responses to diet or disease challenge. However, by combining transcriptomics with proteomics and metabolomics, it is now plausible to evolve aquaculture nutrition from the viewpoints of enhanced growth and survival to the development of premium advanced functional feeds that help to attain all desired phenotypes. Close proximity of proteins and metabolites to the desired phenotype makes proteomics and metabolomics coupled to bioinformatics a powerful trinomial tool to elucidate functional perturbations in an organism under specific circumstances at a given time. Collectively, omics technologies have unveiled new knowledge regarding specific biomarkers and metabolic pathways associated with specific dietary components or disease challenges across several aquaculture research domains and contributed to defining the future of sustainable aquaculture.

Keywords: *Aquaculture Nutrition, Omics, Advanced functional feeds, Metabolic pathways, Biomarkers*

Introduction

Aquaculture is defined as the farming of aquatic animals and plants for commercial food production and has become the fastest growing food production sector in the last 30 years (FAO, 2018). Due to human population growth, global demand for animal protein has significantly increased meaning that food supply must increase 25-70% by 2050 (Hunter, Smith, Schipanski, Atwood, & Mortensen, 2017) — aquaculture is a critical industry for meeting increased protein demand and maintaining future global food security. Traditionally, around 70% of aquaculture production required feed input reliant on wild-capture fisheries resources; however, a diverse range of alternative sustainable protein sources are now being used (Hua *et al.*, 2019). As a founding principle, aquaculture seeks to rear high-health animals with enhanced growth while maintaining low production costs, minimizing environmental impact, and complying with social license. Growth is maximised by combining complementary raw feed materials of known nutritional value to produce species-specific advanced formulated aquafeeds.

Reports of diets and diet additives that promote growth and health in aquaculture species are abundant in the literature (Encarnação, 2016; Mustafa & Al-Faragi, 2021). For example, commercially available aquafeed Novacq™ is supplemented with a marine microbial biomass that promoted 30% faster growth and immunity in black tiger shrimp *Penaeus monodon* (B. Glencross *et al.*, 2014; Noble *et al.*, 2021; Rombenso, Duong, Hines, Mã, & Simon, 2021; Sellars *et al.*, 2015). In *Penaeus vannamei*, supplementation of yeast autolysate enhanced growth, improved feed conversion rate (FCR), and provided immunity against challenge with *Vibrio parahaemolyticus* (Ma *et al.*, 2020). Similarly, *P. vannamei* supplemented vitamin D₃ (0.48 mg/kg) increased immunity, antioxidant capacity and expression of genes related to lipid synthesis (Dai *et al.*, 2021). Recent strategies have also included the used of live bacteria as prebiotic or probiotic additives to promote health status, disease resistance, gut microbiome, and water quality (El-Saadony *et al.*, 2021; Knipe, Temperton, Lange, Bass, & Tyler, 2021). For example, live *Lactobacillus pentosus* and *Arthrospira platensis* supplemented into the feed enhanced growth and lowered FCR in *P. vannamei* (Liu *et al.*, 2022). Lower FCR was associated with enhanced digestive capacity indicated by increased trypsin activity in shrimp fed live bacteria and *A. platensis*. Furthermore, supplementation of bacterial extracts from *L. pentosus* combined with *A. platensis* enhanced survival as a result of upregulated expression of immune-related genes. Lastly, supplementation *L.*

pentosus and *A. platensis* reduced the presence of harmful bacteria in shrimp intestine (Liu *et al.*, 2022).

Traditional aquaculture nutrition methods focussed on growth performance at different ingredient inclusion levels to define essential nutrient requirements but did not further investigate molecular mechanisms underlying beneficial ingredients. However, advances in expectations from ingredient manufacturers and feed formulators (Glencross, 2020), as well as recent advances in high throughput omics technologies (Tripathy, Khatei, & Parhi, 2021), have helped elucidate the underlying functions of diet formulations or diet additives and assisted in understanding their effects on animal nutrition and health. Transcriptomics has been the most widely used tool for exploring the effect of diets on animal physiology and metabolism in aquaculture. However, the use of proteomics and metabolomics will be the focus in this mini review given the proximity of these tools along the omics cascade for measuring the desired phenotype. The use of proteomics and metabolomics has increased in broodstock management, assessing health and nutrition of aquaculture species, and in determining the quality of raw materials (Carrera, Piñeiro, & Martinez, 2020; Jasour *et al.*, 2018; Lulijwa, Alfaro, & Young, 2021; Nguyen, Alfaro, Mundy, Petersen, & Ragg, 2022; Nissa, Pinto, Parkar, Goswami, & Srivastava, 2021; Roques *et al.*, 2020). Specifically, metabolomics has been implemented to decode the composition of raw materials used in aquaculture and monitor the same metabolites in animal plasma following consumption of raw materials supplemented in aquafeeds (Deborde *et al.*, 2021).

Proteomics

Mass spectrometry (MS)-based proteomics is divided into two major approaches: discovery and targeted proteomics (Figure 1). In both approaches, a mass spectrometer is used to separate ions based on their mass to charge ratio and to quantify their abundance. Discovery proteomics is commonly used when information about an organism is limited, and no specific protein targets have yet been identified. For example, discovery proteomics has been employed to identify proteins involved in sexual maturation, sperm and egg structure, motility, acrosomal reaction, and fertilization in male and female abalone (Mendoza-Porras *et al.*, 2014). In the same study, gene ontology analysis revealed clear differences between female and male protein gonadic profiles reflecting a higher rate of protein synthesis in the ovary and higher metabolic activity in the testis. Discovery proteomics is also a very useful resource to help discriminate proteins of high sequence

homology. For example, discovery proteomics was used to resolve the complexity of highly relevant proteins such as shrimp haemocyanin (Mendoza-Porras *et al.*, 2020; Wang, Janech, & Burnett, 2019) and to highlight the medical implications of seafood allergens (Mendoza-Porras *et al.*, 2020).

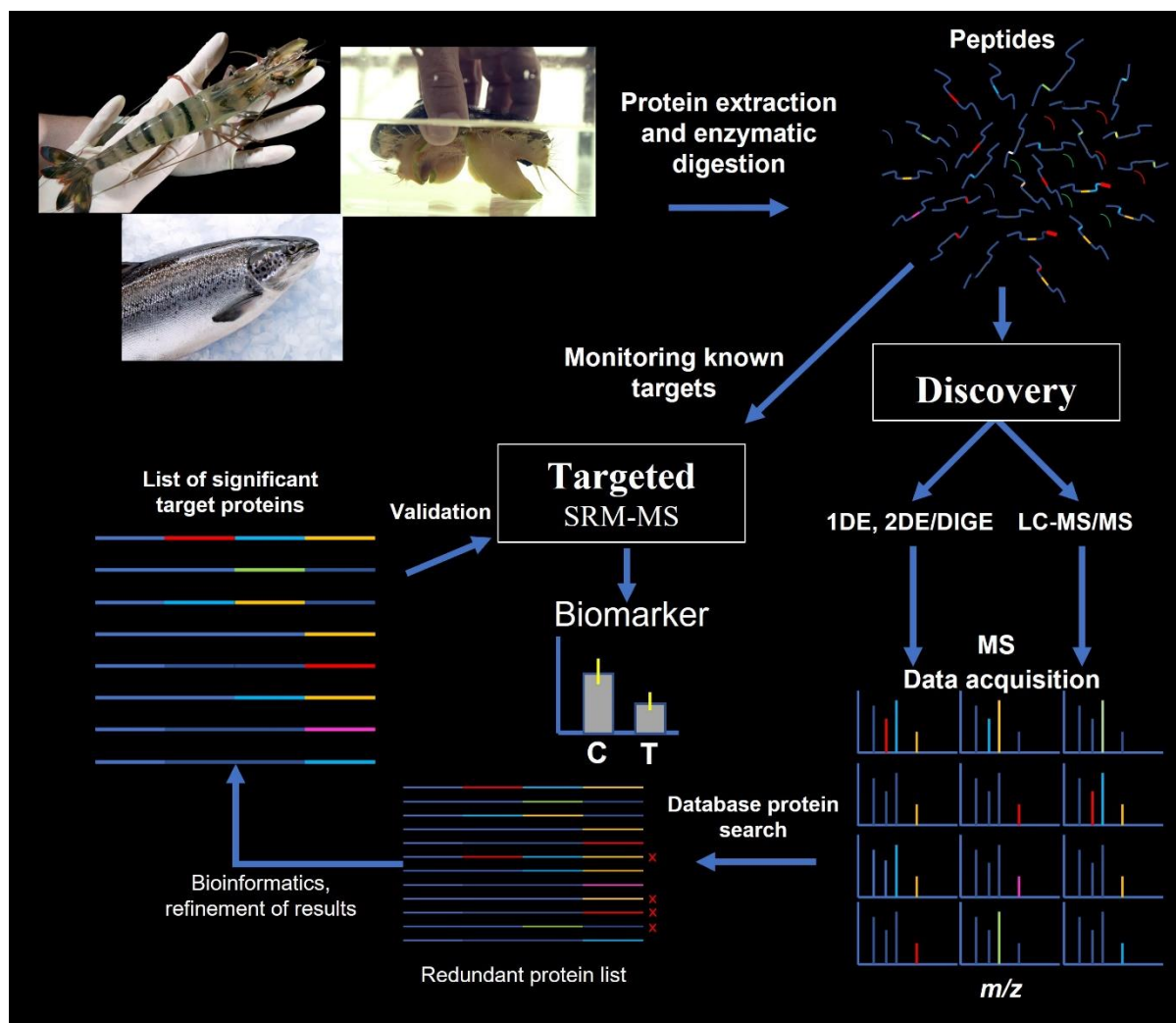


Figure 1. Workflow of sample preparation for discovery and targeted proteomics. 1DE, one-dimensional electrophoresis. 2DE, two-dimensional electrophoresis. DIGE, differential in gel electrophoresis. LC, liquid chromatography. MS, mass spectrometry. SRM, selected reaction monitoring. m/z , mass-to-charge ratio. C, control. T, treatment.

Application of MS-based targeted proteomics in aquaculture has not been widely utilised but has significant potential. This method is a specific, accurate, reproducible, and can quantify dozens of peptide targets from a single complex protein mixture in the same analytical instrument run.

Targeted proteomics requires considerable knowledge of the targets of interest but offers a more reliable, alternative approach to immunoassay-based approaches, such as ELISA (Colgrave, Goswami, Blundell, Howitt, & Tanner, 2014). For example, this approach was used to quantify the changes in abundance of reproductive proteins in male and female abalone following artificial spawning (Mendoza-Porras, Botwright, *et al.*, 2017; Mendoza-Porras, Harris, *et al.*, 2017) and indicated positive associations between abundance of thermal and oxidative stress proteins and propensity or failure to spawn in female abalone gonads. Similarly, a non-invasive, integrated discovery and targeted proteomics approach was employed for exploring the haemolymph of geoduck clam *Panopea generosa* in a reproductive maturation study (Timmins-Schiffman *et al.*, 2017). Targeted proteomics is also often employed to validate discovery proteomics findings (Mendoza-Porras, Botwright, *et al.*, 2017; Nissa, Pinto, Mukherjee, *et al.*, 2021; Timmins-Schiffman *et al.*, 2017).

Aquaculture nutrition and health

Several studies have used proteomic approaches to observe the effect of diet additives on the health and growth of aquatic species (Table 1). Two-dimensional electrophoresis (2DE) coupled-MS is a technique that allows separation of proteins based on isoelectric point in the first dimension. The second dimension consists of separating proteins according to their molecular weight. In this way, a control group and a treatment group can be directly compared by quantification of protein abundance and protein identity determined by MS and subsequent database search. For example, 2DE proteomics were employed in a study involving rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry, where supplementation with 0.2% beta-glucan enhanced growth (Ghaedi, Keyvanshokoh, Mohammadi Azarm, & Akhlaghi, 2016). In this study, structural muscle proteins myosin and tropomyosin were identified with differential abundance by 2DE proteomics and associated to the observed growth through hyperplasia and hypertrophy mechanisms (Ghaedi *et al.*, 2016). A different 2DE proteomics study identified and helped link heat stress proteins and regulatory enzymes to altered metabolism in rainbow trout following dietary inclusion of soybean meal (Martin *et al.*, 2003). Furthermore, the negative impact of soybean meal was attributed to anti-nutritional factors present in soybean (Martin *et al.*, 2003). Proteomics was also used to investigate the effects of plant-based diets incorporating specific marine ingredients (squid 10% and krill 5%) compared to fishmeal (FM) on the proteome of gilthead seabream *Sparus aurata* (Estruch *et al.*,

2020). Entire replacement of FM led to poor growth performance and changes in the gut mucosal proteome, but seabream fed plant-based diets including marine ingredients displayed biometrics and gut proteome status similar to the group fed only FM (Estruch *et al.*, 2020). Analysis of the underlying molecular processes revealed that pathways, such as phagosome, proteasome, and amino sugar and nucleotide sugar metabolism pathways, were altered between the groups fed FM and plant-based diets (Estruch *et al.*, 2020). In a dietary study involving Atlantic salmon where fish oil (FO) was replaced with vegetable oil, a combined transcriptomic and proteomic approach revealed significant pathways alterations in proteasome proteolysis, oxidative and cellular stress responses, apoptosis, and structure integrity (Morais *et al.*, 2012).

Table. 1. Brief summary of proteomics and metabolomics utilisation in aquaculture.

Approach	Analytical platform	Concept/inclusion	Species	Tissue	Outcome/enhanced trait/molecular process	Reference
Proteomics	LC-MS/MS	Soybean meal	<i>Salmo Salar</i>	Mucus	Immune response	(Djordjevic, Morales-Lange, Øverland, Mercado, & Lagos, 2021)
	LC-MS/MS	Plant-based with and without marine sources	<i>Sparus aurata, L</i>	Gut mucosa	Growth, gut proteome	(Estruch <i>et al.</i> , 2020)
	TMT, ESI-MS/MS	Carotenoid	<i>Larimichthys crocea</i>	Blood, dorsal skin and ventral skin, muscle	Skin colour	(Luo <i>et al.</i> , 2020)
	2DE-DIGE, MALDI TOF/TOF	Chronic stress	<i>Sparus aurata, L</i>	Plasma	Chronic stress markers	(Raposo de Magalhães <i>et al.</i> , 2020)
	2DE, LC-MS/MS	Hypoxic stress	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Gills	Hypoxia markers	(Xu, Zheng, Wu, Jiang, & Zou, 2019)
	LC-MS/MS	High temperature	<i>Salmo salar</i>	Liver	Heat stress markers	(Nuez-Ortín, Carter, Nichols, Cooke, & Wilson, 2018)
	LC-MS/MS, SRM	Sexual maturation	<i>Panopea generosa</i>	Gonad, haemolymph	Reproductive markers	(Timmins-Schiffman <i>et al.</i> , 2017)
	2DE-DIGE, LC-MS/MS, SRM	Sexual maturation	<i>Haliotis laevis</i>	Gonad	Reproductive markers	(Mendoza-Porras, Botwright, <i>et al.</i> , 2017)
	2DE-DIGE, LC-MS/MS, SRM	Sexual maturation	<i>Haliotis laevis</i>	Gonad	Reproductive markers	(Mendoza-Porras, Harris, <i>et al.</i> , 2017)
	2DE, MALDI-TOF/TOF MS	Beta-glucans	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Muscle	Growth	(Ghaedi <i>et al.</i> , 2016)
	LC-MS/MS	Sexual maturation	<i>Haliotis laevis</i>	Gonad	Reproductive markers	(Mendoza-Porras <i>et al.</i> , 2014)
	2DE-DIGE, MALDI TOF/TOF	Vegetable oil	<i>Salmo Salar</i>	Intestine	Lipid and energy metabolism	(Morais <i>et al.</i> , 2012)
	2DE-PAGE-MS	Farming environment	<i>Sparus aurata, L</i>	Liver, muscle	Muscle quality	(Addis <i>et al.</i> , 2010)
Metabolomics	GC-MS	Prebiotic cellulose fibre and probiotic	<i>Penaeus vannamei</i>	Gill, haemolymph	Immune response, energy metabolism	(Alfaro <i>et al.</i> , 2022)
	GC-MS	Disease challenge	<i>Penaeus vannamei</i>	Haemolymph	Several amino acids, TCA cycle	(Nguyen, Alfaro, Arroyo, Leon, & Sonnenholzner, 2021)
	Q-ToF-MS	Black soldier fly meal	<i>Penaeus vannamei</i>	Muscle	Determining optimal inclusion level	(Chen <i>et al.</i> , 2021)
	¹ H NMR	Plant-based	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Plasma	Amino acid dynamics in plasma	(Deborde <i>et al.</i> , 2021)
	GC-MS	Probiotic combine with pathogen challenge	<i>Haliotis iris</i>	Foot muscle	Transsulfuration and glutathione pathways	(Grandiosa, Young, Van Nguyen, Mérien, & Alfaro, 2020)
	¹ H NMR	Mussel meal, zygomycete meal, extracted baker's yeast, non-extracted baker's yeast	<i>Salvelinus alpinus</i>	Liver, muscle	Several metabolites, general metabolism	(Wagner <i>et al.</i> , 2019)
	GC-TOF-MS	Coconut oil and fish oil blends	<i>Penaeus vannamei</i>	Gill, hepatopancreas	Enhanced growth, survival, higher tyrosine, lysine, serine	(Chen <i>et al.</i> , 2019)
	¹ H NMR	Quality control, high, low biogenic amines in fishmeal	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Plasma	Branched-chain amino acid, energy metabolism	(Jasour <i>et al.</i> , 2018)

Approach	Analytical platform	Concept/inclusion	Species	Tissue	Outcome/enhanced trait/molecular process	Reference
	GC-MS	Probiotics	<i>Haliotis iris</i>	Foot muscle	Enhanced growth, central carbon metabolism	(Grandiosa <i>et al.</i> , 2018)
	¹ H NMR	Sesamin	<i>Salmo Salar</i>	Liver, muscle	Energy metabolism	(Wagner, Trattner, Pickova, Gómez-Requeni, & Moazzami, 2014)
	¹ H NMR	Feather meal	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Liver, plasma	Energy metabolism	(Jasour <i>et al.</i> , 2017)

LC, liquid chromatography. MS, mass spectrometry. TMT, tandem mass tag. ESI, electrospray ionisation. 2DE, two-dimensional electrophoresis. DIGE, differential in gel electrophoresis. MALDI, Matrix-assisted laser desorption/ionization. TOF, time of flight. SRM, selected reaction monitoring. PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis. GC, gas chromatography. ¹H NMR, proton nuclear magnetic resonance. For comprehensive reviews please read references: (Dettmer, Aronov, & Hammock, 2007; Lulijwa *et al.*, 2021; Nguyen *et al.*, 2022; Nissa, Pinto, Parkar, *et al.*, 2021; Roques *et al.*, 2020)

The replacement of wild-capture FM or FO with novel raw materials of equivalent nutrient composition has been extensively described elsewhere (Byelashov & Griffin, 2014; Turchini, Trushenski, & Glencross, 2019); however, the key molecular mechanisms controlling FM and FO stimulated growth have been poorly studied. This mini-review provides a good opportunity to investigate more deeply the mechanisms controlling energy utilisation and growth. It is important to identify which energy utilisation pathways are activated by FM and FO and how they compare with the pathways activated by novel raw ingredients. When animal growth following administration of novel material is similar to FM or FO, several unanswered questions remain: Are similar molecular pathways utilised for nutrient assimilation between ingredients? Could this lead to discovery of biomarkers that make aquaculture nutrition more efficient?

The study by Estruch *et al.* (2020) exemplifies the power of omics technologies to go beyond the provision of a list of “significant” molecules and actually try to understand the mechanisms that regulate the preferential pathways activated during energy generation as a result of including specific ingredients in aquafeeds. Understanding this would be advantageous to trigger key pathways or processes by selecting precise complementary raw materials that promote better growth and health in aquaculture species.

The potential of climate change to exceed temperature tolerance limits in fish is a global concern in aquaculture, particularly given most fish are ectotherms and unable to regulate body temperature (Neuheimer, Thresher, Lyle, & Semmens, 2011). Sustained thermal stress impairs optimal growth in fish as it affects feed intake making fish more susceptible to disease. As an example, the salmon industry in Tasmania, Australia has been affected by summer heatwaves where affected fish experienced reduced feed intake, impaired metabolism, and flesh decolouration (Wade *et al.*, 2019). In this regard, discovery proteomics identified markers associated with thermal and oxidative stress in Atlantic salmon *Salmo salar* subjected to elevated temperatures (Nuez-Ortín *et al.*, 2018). Following a comparison between a control group reared at 15°C and salmon treated at 21°C, 276 proteins showed significant differential abundance between the groups including ferritin and heat shock protein 70 kDa, both of which are involved in redox and heat stress regulation (Nuez-Ortín *et al.*, 2018). Hypoxia, that often co-occurs alongside thermal stress, has also been studied by 2DE proteomics. Comparison of normoxic versus hypoxic groups identified six key proteins involved in the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signalling pathway in gills of grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Xu *et al.*, 2019). A comprehensive proteomics study using 2DE

coupled to fluorescence and mass spectrometry compared overcrowding, net handling, and hypoxia as stressors of gilthead seabream and identified perturbations in essential immune pathways. Additionally, the abundance of the protein warm-temperature acclimation-related 65 kDa protein (Wap65) significantly increased in net-handled and hypoxic fish (Raposo de Magalhães *et al.*, 2020) suggesting Wap65 could be used as a potential biomarker for aquaculture fish welfare. Whether the stimulus comes from disease, environmental parameters, or other stress factors, identification of key proteins or metabolites that indicate an impact on the animal is paramount for the successful development of interventional strategies. Of similar importance is the development and validation of biomarkers that allow the precise identification of temperature stress thresholds. The implementation of dietary intervention strategies to mitigate stressors experienced by farmed animals can not only boost performance, survival, and product quality, but improve animal welfare in aquaculture.

Metabolomics

Proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) is the most common platform employed in metabolomics studies followed by MS-based metabolomics (Lulijwa *et al.*, 2021) (Table 1). Similar to proteomics, metabolomics is divided into discovery and targeted modes as the two major approaches for identifying and quantifying metabolites. LC-MS-based discovery metabolomics has the advantage of identifying thousands of compounds; however, one frequent constraint in this approach is that some compounds lack annotation leading to several potential targets remaining unknown. Targeted metabolomics, similar to proteomics, requires the identity of target metabolites to be known. For example, targeting central carbon metabolism compounds can include the identity of ~200 metabolites and could help make inferences regarding biomass and energy generation and draw conclusions about underlying pathways (Gyawali *et al.*, 2021).

In recent years, metabolomics has become an important tool for evaluating the effects of disease and diet additives on multiple aquaculture species (Alfaro *et al.*, 2022; Grandiosa *et al.*, 2020; Jasour *et al.*, 2018; Wagner *et al.*, 2014). The omics cascade indicates that the metabolome response is most closely linked with what is occurring within the animal and is therefore predictive of phenotype (Dettmer *et al.*, 2007). As such, it is reasonable to conclude that metabolomics is the ideal tool for determining the influence of diet on animal physiology and metabolism or the response of an animal following disease challenge.

Metabolomics - Nutrition and health

Metabolomics has been widely used to explore the effect of novel material in aquafeeds. For example, influence of sesamin in vegetable oil-based diets with varying levels of n-6/n-3 fatty acids was explored in muscle and liver of Atlantic salmon (Wagner *et al.*, 2014) revealing that high levels of sesamin were not beneficial for salmon growth. Furthermore, the abundance of eight metabolites involved in energy metabolism significantly increased in liver indicating that high levels of sesamin were detrimental for liver function. Sesamin inclusion did not compromise muscle freshness as hypoxanthine, a metabolite used to determine post-mortem interval (Donaldson & Lamont, 2013), could not be detected (Wagner *et al.*, 2014). The dietary effects of feather meal (FTH) inclusions on metabolism were evaluated in rainbow trout where 8% and 24 % FTH increased feed intake and specific growth rate (Jasour *et al.*, 2017). However, it was also reported that lower levels of FTH might be more suitable for replacing FM as 24% FTH inclusion may compromise the TCA cycle as evidenced by higher concentrations of what appeared to be unutilised hepatic pyruvate, lower levels of ATP, and lactate levels in blood and liver that positively correlated with high FTH (Jasour *et al.*, 2017).

¹H-NMR metabolomics assessed the suitability of mussel meal (MM), zygomycete meal (ZYG), extracted baker's yeast (EY), and non-extracted baker's yeast (NY) as FM replacements for Artic Charr (*Salvelinus alpinus*). Metabolites from the liver and muscle were affected following NY and EY feeding, respectively, compared with a reference diet. However, fish fed MM suffered less metabolic changes compared to animals fed other test feeds, leading to the proposal that MM was potentially the best ingredient to replace FM in Artic Charr (Wagner *et al.*, 2019). Metabolomics was also used to determine the effects of different lipid sources (coconut oil, FO, and a mixture of both) on *P. vannamei* metabolism (when cultured at 3 or 30 ppt salinity) (Chen *et al.*, 2019). Shrimp fed the oil mixture showed higher growth and survival while the gills and hepatopancreas of shrimp fed FO had higher levels of unsaturated fatty acids regardless of salinity. Shrimp reared at 3 ppt and fed coconut oil as a lipid source displayed higher levels of tyrosine, lysine, and serine compared with shrimp reared at 30 ppt (Chen *et al.*, 2019).

Incorporation of dietary probiotics has become a common practice to enhance growth and immunity in several aquaculture species and metabolomics has been used to elucidate some of the molecular process underlying these enhanced performance traits. For example, *Haliotis iris* abalone fed a commercial diet supplemented with multi-strain probiotics achieved better growth

than abalone fed only the commercial diet (Grandiosa *et al.*, 2018). Analysis of haemolymph revealed that after 16 weeks of treatment, total haemocyte count and cell viability were significantly higher in abalone fed probiotics. Metabolomics analysis of abalone foot muscle indicated unique expression of several metabolites in the abalone that were fed probiotics. These findings indicate that changes to central carbon metabolism promoted by probiotic supplemented diets could improve survival and growth of abalone (Grandiosa *et al.*, 2018).

In a different study, foot muscle from *H. iris* was analysed by metabolomics after a four-month feeding regime with a commercial diet supplemented with probiotics and following infection with *Vibrio splendidus* (Grandiosa *et al.*, 2020). Differential regulation in the transsulfuration and glutathione pathways were observed in infected animals, a result consistent with ROS disruptions observed in other molluscs under bacterial infection (Grandiosa *et al.*, 2020). A recent metabolomics study elucidated some of the molecular mechanisms stimulated in *P. vannamei* as a synergic result of incorporating both prebiotic cellulose fibre and probiotic *Vibrio alginolyticus* in the diet (Alfaro *et al.*, 2022). On the basis of metabolomic profiles, it was concluded that combining cellulose fibre with *V. alginolyticus* generated a better immune response compared with groups fed a control diet combined with cellulose fibre or probiotics alone (Alfaro *et al.*, 2022).

Another recent metabolomics study focused on shrimp health identified the metabolic perturbations in *P. vannamei* challenged with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) (Nguyen *et al.*, 2021). Several amino acids and components of the TCA cycle were differentially regulated in infected shrimp compared to shrimp not exposed to *V. parahaemolyticus* leading to pathway perturbations on TCA cycle, amino acid metabolism and gluconeogenesis (Nguyen *et al.*, 2021). There are also examples where metabolomics has been used to determine the optimal inclusion levels of dietary components based on the molecular pathways they stimulate. For example, lipid synthesis and lipolysis were boosted by inclusion of 20% black soldier fly (BSF) meal after a 7-week feeding trial in *P. vannamei* (Chen *et al.*, 2021). In contrast, dietary BSF meal inclusion at 30% was shown to be detrimental for beta-oxidation, glycolysis, and synthesis of unsaturated fatty acids (Chen *et al.*, 2021).

The quality of raw materials and feed ingredients directly impacts the performance of aquafeeds, and metabolomics is a suitable tool to assess the quality of raw materials and the effect these ingredients can have on aquaculture species. Metabolomics was used to identify the metabolic effects of varying biogenic amine levels in rainbow trout. Better growth was achieved in fish fed a

FM diet where the FM used was low in biogenic amines compared with diets where the FM had a higher content of biogenic amines (Jasour *et al.*, 2018). This positively correlated with higher abundances of branched-chain amino acids leucine and isoleucine, involved in ATP generation in the tricarboxylic cycle, in fish fed FM with a low content of biogenic amines. Conversely, decreased growth was observed when these amino acids were lower in the liver of fish fed the diet containing FM with a higher content of biogenic amines (Jasour *et al.*, 2018).

Metabolomics can provide information about the components of a feed and can also be used to monitor these components after feeding. For example, Pterin, a biomarker for plant feedstuff, was identified by ¹H-NMR metabolomic analysis of both the plant-based diet and plasma of rainbow trout after feeding (Deborde *et al.*, 2021). Furthermore, a higher amino acid content was measured in plasma of fish fed the plant-based diet compared with fish fed a FM and FO commercial diet, suggesting that amino acid delivery is delayed or underutilised in fish fed plant-based diets (Deborde *et al.*, 2021).

Incorporation of omics technologies in aquaculture can elucidate the molecular basis of improved animal performance and beneficial traits in aquaculture enabling the manufacture of advanced diets that provide specific nutrients intended to complement metabolic pathways underlying these performance traits. As a result, omics technologies can help refine aquaculture processes intended to increase production yield while ensuring environmental sustainability and promoting animal welfare and social license.

References

- Addis, M. F., Cappuccinelli, R., Tedde, V., Pagnozzi, D., Porcu, M. C., Bonaglini, E., Roggio, T., & Uzzau, S. (2010). Proteomic analysis of muscle tissue from gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) farmed in offshore floating cages. *Aquaculture*, 309(1), 245-252. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.022>
- Alfaro, A. C., Nguyen, T. V., Rodríguez, J. A., Bayot, B., Domínguez-Borbor, C., Sonnenholzner, S., Azizan, A., & Venter, L. (2022). Evaluation of immune stimulatory products for whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) by a metabolomics approach. *Fish & Shellfish Immunology*, 120, 421-428. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.12.007>
- Byelashov, O. A., & Griffin, M. E. (2014). Fish in, fish out: perception of sustainability and contribution to public health. *Fisheries*, 39(11), 531-535. doi:<https://doi.org/10.1080/03632415.2014.967765>
- Carrera, M., Piñeiro, C., & Martínez, I. (2020). Proteomic strategies to evaluate the impact of farming conditions on food quality and safety in aquaculture products. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(8), 1050. doi:10.3390/foods9081050
- Chen, K., Li, E., Xu, C., Wang, X., Li, H., Qin, J. G., & Chen, L. (2019). Growth and metabolomic responses of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to different dietary fatty acid sources and salinity levels. *Aquaculture*, 499, 329-340. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.056>
- Chen, Y., Chi, S., Zhang, S., Dong, X., Yang, Q., Liu, H., Tan, B., & Xie, S. (2021). Effect of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal on lipid and glucose metabolism of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *British Journal of Nutrition*, 1-15. doi:10.1017/S0007114521004670
- Colgrave, M. L., Goswami, H., Blundell, M., Howitt, C. A., & Tanner, G. J. (2014). Using mass spectrometry to detect hydrolysed gluten in beer that is responsible for false negatives by ELISA. *Journal of Chromatography A*, 1370, 105-114. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.033>
- Dai, T., Jiao, L., Tao, X., Lu, J., Jin, M., Sun, P., & Zhou, Q. (2021). Effects of dietary vitamin D3 supplementation on the growth performance, tissue Ca and P concentrations, antioxidant capacity, immune response and lipid metabolism in *Litopenaeus vannamei* larvae. *British Journal of Nutrition*, 1-20. doi:10.1017/S0007114521004931
- Deborde, C., Hounoum, B. M., Moing, A., Maucourt, M., Jacob, D., Corraze, G., Médale, F., & Fauconneau, B. (2021). Putative imbalanced amino acid metabolism in rainbow trout long term fed a plant-based diet as revealed by 1H-NMR metabolomics. *Journal of Nutritional Science*, 10, e13. doi:10.1017/jns.2021.3
- Dettmer, K., Aronov, P. A., & Hammock, B. D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1), 51-78. doi:<https://doi.org/10.1002/mas.20108>
- Djordjevic, B., Morales-Lange, B., Øverland, M., Mercado, L., & Lagos, L. (2021). Immune and proteomic responses to the soybean meal diet in skin and intestine mucus of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*, 27(4), 929-940. doi:<https://doi.org/10.1111/anu.13248>
- Donaldson, A. E., & Lamont, I. L. (2013). Biochemistry changes that occur after death: potential markers for determining post-mortem interval. *PLOS ONE*, 8(11), e82011. doi:10.1371/journal.pone.0082011

- El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M. A. O., Dhama, K., & Abdel-Latif, H. M. R. (2021). The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. *Fish & Shellfish Immunology*, *117*, 36-52. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.007>
- Encarnação, P. (2016). 5 - Functional feed additives in aquaculture feeds. In S. F. Nates (Ed.), *Aquafeed Formulation* (pp. 217-237). San Diego: Academic Press.
- Estruch, G., Martínez-Llorens, S., Tomás-Vidal, A., Monge-Ortiz, R., Jover-Cerdá, M., Brown, P. B., & Peñaranda, D. S. (2020). Impact of high dietary plant protein with or without marine ingredients in gut mucosa proteome of gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). *Journal of Proteomics*, *216*, 103672. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103672>
- FAO. (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome.
- Ghaedi, G., Keyvanshokoh, S., Mohammadi Azarm, H., & Akhlaghi, M. (2016). Proteomic analysis of muscle tissue from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed dietary β -glucan. *Iranian journal of veterinary research*, *17*(3), 184-189.
- Glencross, B., Irvin, S., Arnold, S., Blyth, D., Bourne, N., & Preston, N. (2014). Effective use of microbial biomass products to facilitate the complete replacement of fishery resources in diets for the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, *431*, 12-19. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.033>
- Glencross, B. D. (2020). A feed is still only as good as its ingredients: An update on the nutritional research strategies for the optimal evaluation of ingredients for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition*, *26*(6), 1871-1883. doi:<https://doi.org/10.1111/anu.13138>
- Grandiosa, R., Mérien, F., Young, T., Van Nguyen, T., Gutierrez, N., Kitundu, E., & Alfaro, A. C. (2018). Multi-strain probiotics enhance immune responsiveness and alters metabolic profiles in the New Zealand black-footed abalone (*Haliotis iris*). *Fish & Shellfish Immunology*, *82*, 330-338. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.034>
- Grandiosa, R., Young, T., Van Nguyen, T., Mérien, F., & Alfaro, A. C. (2020). Immune response in probiotic-fed New Zealand black-footed abalone (*Haliotis iris*) under *Vibrio splendidus* challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, *104*, 633-639. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.06.007>
- Gyawali, P., Karpe, A. V., Hillyer, K. E., Nguyen, T. V., Hewitt, J., & Beale, D. J. (2021). A multi-platform metabolomics approach to identify possible biomarkers for human faecal contamination in Greenshell™ mussels (*Perna canaliculus*). *Science of The Total Environment*, *771*, 145363. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145363>
- Hua, K., Cobcroft, J. M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D. R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M. J., Zeng, C., Zenger, K., & Strugnell, J. M. (2019). The future of aquatic protein: implications for protein sources in aquaculture diets. *One Earth*, *1*(3), 316-329. doi:<https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.018>
- Hunter, M. C., Smith, R. G., Schipanski, M. E., Atwood, L. W., & Mortensen, D. A. (2017). Agriculture in 2050: recalibrating targets for sustainable intensification. *BioScience*, *67*(4), 386-391. doi:10.1093/biosci/bix010
- Jasour, M. S., Wagner, L., Sundekilde, U. K., Larsen, B. K., Greco, I., Orlien, V., Olsen, K., Rasmussen, H. T., Hjermslev, N. H., Hammershøj, M., Dalsgaard, A. J. T., & Dalsgaard, T. K. (2017). A comprehensive

- approach to assess feathermeal as an alternative protein source in aquafeed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(48), 10673-10684. doi:10.1021/acs.jafc.7b04201
- Jasour, M. S., Wagner, L., Sundekilde, U. K., Larsen, B. K., Rasmussen, H. T., Hjermitsev, N. H., Hammershøj, M., Dalsgaard, A. J. T., & Dalsgaard, T. K. (2018). Fishmeal with different levels of biogenic amines in aquafeed: comparison of feed protein quality, fish growth performance, and metabolism. *Aquaculture*, 488, 80-89. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.030
- Knipe, H., Temperton, B., Lange, A., Bass, D., & Tyler, C. R. (2021). Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 324-352. doi:https://doi.org/10.1111/raq.12477
- Liu, L., Cai, X., Ai, Y., Li, J., Long, H., Ren, W., Huang, A., Zhang, X., & Xie, Z.-y. (2022). Effects of *Lactobacillus pentosus* combined with *Arthrospira platensis* on the growth performance, immune response, and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 120, 345-352. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.12.005
- Lulijwa, R., Alfaro, A. C., & Young, T. (2021). Metabolomics in salmonid aquaculture research: applications and future perspectives. *Reviews in Aquaculture*, n/a(n/a). doi:https://doi.org/10.1111/raq.12612
- Luo, K., Li, J., Chen, J., Pan, Y., Zhang, Y., Zhou, H., Zhang, W., & Mai, K. (2020). Proteomics analysis of skin coloration of large yellow croaker *Larimichthys crocea* fed different dietary carotenoids. *Aquaculture Nutrition*, 26(6), 1981-1993. doi:https://doi.org/10.1111/anu.13140
- Ma, S., Wang, X., Gao, W., Xu, W., Zhang, W., & Mai, K. (2020). Effects of yeast autolysate in the practical diet on the growth performance, immune response, and disease resistance of Pacific white shrimp. *Journal of Aquatic Animal Health*, 32(3), 109-115. doi:https://doi.org/10.1002/aah.10095
- Martin, S. A. M., Vilhelmsson, O., Médale, F., Watt, P., Kaushik, S., & Houlihan, D. F. (2003). Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1651(1), 17-29. doi:https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00231-0
- Mendoza-Porras, O., Botwright, N. A., McWilliam, S. M., Cook, M. T., Harris, J. O., Wijffels, G., & Colgrave, M. L. (2014). Exploiting genomic data to identify proteins involved in abalone reproduction. *Journal of Proteomics*, 108, 337-353. doi:https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.001
- Mendoza-Porras, O., Botwright, N. A., Reverter, A., Cook, M. T., Harris, J. O., Wijffels, G., & Colgrave, M. L. (2017). Identification of differentially expressed reproductive and metabolic proteins in the female abalone (*Haliotis laevis*) gonad following artificial induction of spawning. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 24, 127-138. doi:https://doi.org/10.1016/j.cbd.2016.04.005
- Mendoza-Porras, O., Harris, J. O., Wijffels, G., Reverter, A., Cook, M. T., Botwright, N. A., & Colgrave, M. L. (2017). Gonadal reproductive and metabolic proteins of male abalone *Haliotis laevis* (Donovan, 1808) assessed by targeted mass spectrometry after artificial induction of spawning. *Aquaculture Research*, 48(12), 6009-6015. doi:https://doi.org/10.1111/are.13413
- Mendoza-Porras, O., Kamath, S., Harris, J. O., Colgrave, M. L., Huerlimann, R., Lopata, A. L., & Wade, N. M. (2020). Resolving hemocyanin isoform complexity in haemolymph of black tiger shrimp *Penaeus monodon* -

- implications in aquaculture, medicine and food safety. *Journal of Proteomics*, 218, 103689. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103689>
- Morais, S., Silva, T., Cordeiro, O., Rodrigues, P., Guy, D. R., Bron, J. E., Taggart, J. B., Bell, J. G., & Tocher, D. R. (2012). Effects of genotype and dietary fish oil replacement with vegetable oil on the intestinal transcriptome and proteome of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, 13(1), 448. doi:10.1186/1471-2164-13-448
- Mustafa, S. A., & Al-Faragi, J. K. (2021). Supplementation of feed additives on aquaculture feeds: a review. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1).
- Neuheimer, A. B., Thresher, R. E., Lyle, J. M., & Semmens, J. M. (2011). Tolerance limit for fish growth exceeded by warming waters. *Nature Climate Change*, 1(2), 110-113. doi:10.1038/nclimate1084
- Nguyen, T. V., Alfaro, A., Arroyo, B. B., Leon, J. A. R., & Sonnenholzner, S. (2021). Metabolic responses of penaeid shrimp to acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 533, 736174. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736174>
- Nguyen, T. V., Alfaro, A. C., Mundy, C., Petersen, J., & Ragg, N. L. C. (2022). Omics research on abalone (*Haliotis* spp.): Current state and perspectives. *Aquaculture*, 547, 737438. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737438>
- Nissa, M. U., Pinto, N., Mukherjee, A., Reddy, P. J., Ghosh, B., Sun, Z., Ghantasala, S., Chetanya, C., Shenoy, S. V., Moritz, R. L., Goswami, M., & Srivastava, S. (2021). Organ-based proteome and post-translational modification profiling of a widely cultivated tropical water fish, *Labeo rohita*. *Journal of Proteome Research*. doi:10.1021/acs.jproteome.1c00759
- Nissa, M. U., Pinto, N., Parkar, H., Goswami, M., & Srivastava, S. (2021). Proteomics in fisheries and aquaculture: an approach for food security. *Food Control*, 127, 108125. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108125>
- Noble, T. H., Rao, M., Briggs, M., Shinn, A. P., Simon, C., & Wynne, J. W. (2021). Novacq™ improves survival of *Penaeus vannamei* when challenged with pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquaculture*, 545, 737235. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737235>
- Nuez-Ortín, W. G., Carter, C. G., Nichols, P. D., Cooke, I. R., & Wilson, R. (2018). Liver proteome response of pre-harvest Atlantic salmon following exposure to elevated temperature. *BMC Genomics*, 19(1), 133. doi:10.1186/s12864-018-4517-0
- Raposo de Magalhães, C., Schrama, D., Farinha, A. P., Revets, D., Kuehn, A., Planchon, S., Rodrigues, P. M., & Cerqueira, M. (2020). Protein changes as robust signatures of fish chronic stress: a proteomics approach to fish welfare research. *BMC Genomics*, 21(1), 309. doi:10.1186/s12864-020-6728-4
- Rombenso, A. N., Duong, M. H., Hines, B. M., Mã, T., & Simon, C. J. (2021). The marine microbial biomass, Novacq™, a useful feed additive for postlarvae and juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 530, 735959. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735959>
- Roques, S., Deborde, C., Richard, N., Skiba-Cassy, S., Moing, A., & Fauconneau, B. (2020). Metabolomics and fish nutrition: a review in the context of sustainable feed development. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 261-282. doi:<https://doi.org/10.1111/raq.12316>

- Sellars, M. J., Rao, M., Polymeris, N., Irvin, S. J., Cowley, J. A., Preston, N. P., & Glencross, B. D. (2015). Feed containing novacq improves resilience of black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, to gill-associated virus-induced mortality. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46(3), 328-336. doi:<https://doi.org/10.1111/jwas.12190>
- Timmins-Schiffman, E. B., Crandall, G. A., Vadopalas, B., Riffle, M. E., Nunn, B. L., & Roberts, S. B. (2017). Integrating discovery-driven proteomics and selected reaction monitoring to develop a noninvasive assay for geoduck reproductive maturation. *Journal of Proteome Research*, 16(9), 3298-3309. doi:10.1021/acs.jproteome.7b00288
- Tripathy, P. S., Khatei, A., & Parhi, J. (2021). Omics in aquaculture. In P. K. Pandey & J. Parhi (Eds.), *Advances in Fisheries Biotechnology* (pp. 83-94). Singapore: Springer Singapore.
- Turchini, G. M., Trushenski, J. T., & Glencross, B. D. (2019). Thoughts for the future of aquaculture nutrition: realigning perspectives to reflect contemporary issues related to judicious use of marine resources in aquafeeds. *North American Journal of Aquaculture*, 81(1), 13-39. doi:<https://doi.org/10.1002/naaq.10067>
- Wade, N. M., Clark, T. D., Maynard, B. T., Atherton, S., Wilkinson, R. J., Smullen, R. P., & Taylor, R. S. (2019). Effects of an unprecedented summer heatwave on the growth performance, flesh colour and plasma biochemistry of marine cage-farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Thermal Biology*, 80, 64-74. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.12.021>
- Wagner, L., Gómez-Requeni, P., Moazzami, A. A., Lundh, T., Vidakovic, A., Langeland, M., Kiessling, A., & Pickova, J. (2019). 1H NMR-based metabolomics and lipid analyses revealed the effect of dietary replacement of microbial extracts or mussel meal with fish meal to Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Fishes*, 4(3), 46.
- Wagner, L., Trattner, S., Pickova, J., Gómez-Requeni, P., & Moazzami, A. A. (2014). 1H NMR-based metabolomics studies on the effect of sesamin in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Chemistry*, 147, 98-105. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.128>
- Wang, J., Janech, M. G., & Burnett, K. G. (2019). Protein-level evidence of novel β -type hemocyanin and heterogeneous subunit usage in the pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Frontiers in Marine Science*, 6. doi:10.3389/fmars.2019.00687
- Xu, Z.-N., Zheng, G.-D., Wu, C.-B., Jiang, X.-Y., & Zou, S.-M. (2019). Identification of proteins differentially expressed in the gills of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) after hypoxic stress by two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Fish Physiology and Biochemistry*, 45(2), 743-752. doi:10.1007/s10695-018-0599-

Aquaculture Nutrition Research at the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation: Maintaining Productivity and Competitiveness in Challenging Times

Artur Rombenso*¹, Ha Truong², and Cedric Simon³

Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, CSIRO, Livestock & Aquaculture Program, Queensland, Australia

¹Bribie Island Research Centre, 144 North Street, Woorim, Queensland, Australia 4507 – artur.rombenso@csiro.au

²Bribie Island Research Centre, 144 North Street, Woorim, Queensland, Australia 4507 – ha.truong@csiro.au

³Queensland Bioscience Precinct, 306 Carmody Road, St Lucia, Queensland, Australia 4067 – cedric.simon@csiro.au

Abstract

The Australian aquaculture industry has faced new challenges brought about by the global pandemic and the consequences of which are only beginning to be fully recognised. In regards to the R&D sector, shifts in strategies for undertaking research are becoming apparent. In light of these new challenges, we aim to share our recent research and insights on maintaining productivity and competitiveness within the shrimp and fish nutrition research context.

Keywords: *research opportunities, strategy, CSIRO, aquaculture nutrition*

Introducing the Aquaculture Nutrition Research at CSIRO

The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO; Australia's Government Research Agency) Nutrition & Production Systems group within the Livestock and Aquaculture Program is responsible for the aquaculture nutrition research, which aims to refine and develop novel aquafeeds and value-added products to improve the diversity, sustainability, and efficiency of the current and prospective aquaculture industry. Our main nutrition research areas include (1) novel functional feeds and formulations, (2) digital technologies for nutrition, mostly near-infrared spectroscopy, (3) circularity in aquaculture nutrition, (4) *in vitro* models of digestion and absorption, (5) hatchery technologies for prawns, and (6) novel phenotypes including feed efficiency, resilience to stress and product quality.

Our footprint has impacts in Australia and in the last decades, overseas. More information about the CSIRO Aquaculture Research can be found at our website - <https://research.csiro.au/aquaculture/>.

Background and aims

The growth potential of the Australian aquaculture industry is driven by the ongoing investment in seawater leases for sea-cage farming, land mainly for pond production, and RAS facilities for aquaculture commercial enterprises as well as the geographic proximity to Asia which fuels demand for premium aquacultured products such as abalone and tuna. In the last two years, the Australian aquaculture industry has faced new challenges brought about by the global pandemic and the consequences of which are only beginning to be fully recognised. In regards to the R&D sector, shifts in strategies for undertaking research are becoming apparent. In light of these new challenges, we aim to share our recent research and insights on maintaining productivity and competitiveness.

Challenges and new opportunities

For most research organisations, the main challenges faced during the pandemic have been reduced or no new R&D funding opportunities, difficulties in recruiting internationally staff and students, postponed milestones/activities of current projects, difficulties with face to face communication internally and with clients, lockdowns of laboratories and research facilities, and slow turnaround of reagents, materials and commercial analyses

Indeed, we have faced most of those with the exception of the absence of international students which fundamentally affected all universities. Fortunately, we experienced only a mild delay in activities, such as experiments and analysis, which were critical to delivering ongoing project milestones. As most new project opportunities were put on hold or lost as ventures reduced severely their R&D budget, we have a renewed focus on strategic internally funded research and adapting our capabilities in the face of the new priorities of the aquafeed industry, domestically and overseas. At the corporate level, CSIRO stepped up efforts to support staff working remotely with the launch of a highly anticipated suite of equipment and resources for working from home in 2020. The new work from home package ‘provides our people with the equipment, resources and support to work more seamlessly between their home and a CSIRO site. This will enable us to continue this flexibility into the future’. CSIRO staff received a range of kit and equipment to support working from home including a laptop, keyboard, mouse, headset, webcam and USB hub, height adjustable desk, an ergonomic chair and a computer monitor. This has helped tremendously in maintaining productivity in a safe working environment.

One successful approach has focused on domestic small and medium enterprises, mainly ingredient companies interested in entering the aquafeed industry. For example, we have worked with companies producing insects, aquaculture by-products and food waste, more details about those will be presented in the research projects section. Another approach has been incorporating nutrition expertise into projects led by other aquaculture science domains such as breeding, production systems and health to work at the intersection of various disciplines to create greater impact. Finally, we have aligned our strong nutrition analytical capability to secure small fee-for-service projects beyond aquaculture. More details about our approaches and ongoing projects will be discussed.

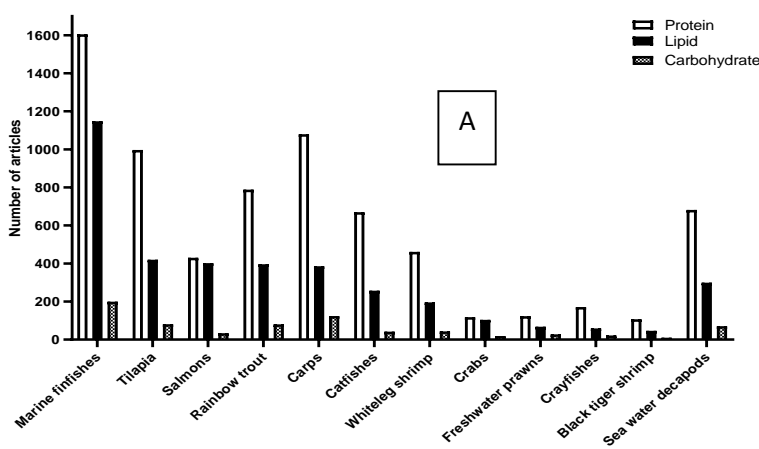
A silver-lining of the travel restrictions and loss of projects could be seen as the freeing of time. This gained time has allowed for more desktop-based activities, and has allowed researchers to work on writing material which had been ‘shelved’ due to lack of time as well as provide an opportunity to shine new light on the intensive research effort to date. The increased output of reports, website articles, technical and peer-review articles has been evident worldwide, which we have contributed to with an increase in the number and diversity of publications during this period. Strategies within authorship, more specifically to strengthen and nurture collaborations, is key.

Research projects and outcomes

This section summarises our ongoing projects and recent publications, including magazine and peer-review articles in shrimp and fish nutrition.

Aquaculture nutrition:

Early 2021, in collaboration with colleagues from Australia, Brazil, China and Mexico, we published a technical review about macronutrient research (protein, lipids and carbohydrates) in aquaculture nutrition (Rombenso *et al.*, 2021). We summarised the scientific literature on macronutrient research between 1990 and 2020, linking with the most produced species worldwide. This was an opportunity to reflect on the status of knowledge in each of these key macronutrients, provide insight into the drivers behind the research effort and identify gaps for future focus (Figure 1). Some of the highlights included the number of peer-reviewed published papers from 1990 to 2020 investigating protein was higher than lipid and carbohydrate in most countries; in marine fish and cold-water species, the difference between lipid and protein research is reduced, but protein was still the priority; considering the volume of major aquacultured species produced, lipid- and carbohydrate-based ingredients are worth at least half of the global aquafeed production costs; the authors encourage a shifting focus from protein-rich sources and increasingly consider the role of lipids and carbohydrates in future formulations.



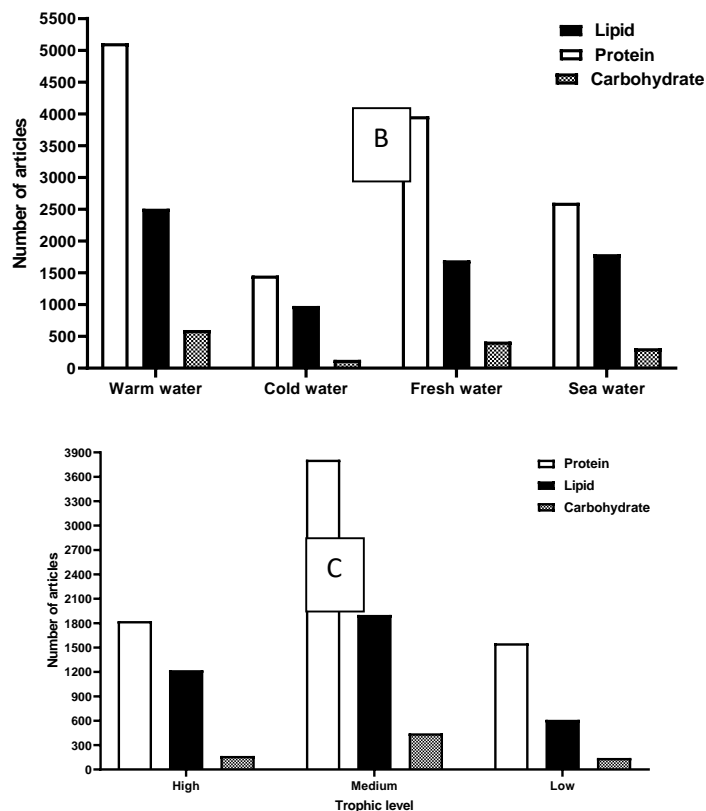


Figure 1. Number of peer-reviewed published articles since 1990 related to protein, lipid and carbohydrate in the top produced species (A), all species collated grouped by their water temperature and salinity preferences (B), and all species collated grouped by their trophic level (C), position of an organism in a food web (High = top carnivores 4-5, Medium = mid-low carnivores 3-4, Low = omnivores and herbivores 2-3). Extracted from Rombenso *et al.*, 2021 – <https://www.globalseafood.org/advocate/macronutrient-research-in-aquaculture-nutrition/>. FishBase (<http://www.fishbase.org/search.php>)

Shrimp nutrition:

In Australia, we strictly work with the native black tiger shrimp *Penaeus monodon* and in China, Thailand and Vietnam with Whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *L. vannamei* is considered a pest species in Australia, along with tilapia. Our capability in shrimp nutrition is broad. Enabled by the flexibility of our facility, we research all life stages from broodstock to harvest size animals in various systems, including various sized tanks, net pens, raceways and ponds. Although most of our research is done in clear water, we have run trials in culture conditions dominated by

autotrophic and heterotrophic organisms. We see our research focus as being aligned with two areas: i) shrimp digestive physiology and nutritional requirements; and ii) the role of nutrition for breeding, health and production. This focus allows us to engage in activities that are of priority to the Australian aquaculture industry while ensuring we are able to satisfy the delivery of impactful science as an R&D organisation.

Feed and feed additives

Novacq

CSIRO has been working in the feed additive space for decades, specifically on the development and characterisation of Novacq™, a dry microbial biomass for shrimp nutrition. CSIRO published research has highlighted the benefits of this feed additive illustrated by enhanced growth (20-60%) and health at 5-10% dietary inclusion rates, and has contributed to the sustainability of aquafeeds enabling successful replacement of marine-origin ingredients and reducing dietary protein content. Recent studies have focused on different life stages (postlarvae and juveniles), species (black tiger prawn and white leg shrimp), culture conditions (clear water, dominated by heterotrophic or photoautotrophic organisms) and growth performance, survival, feed efficiency, health and immunostimulation (Simon *et al.*, 2020; Rombenso *et al.*, 2020; 2021; Noble *et al.*, 2022).

We demonstrated the suitability of custard diets in *P. monodon* postlarvae (PL3 to PL30) and that Novacq™ supplementation (12.7%) in custard diets appears to be a beneficial ingredient in PL nutrition, improving survival and enhancing the growth of better performing PLs (Rombenso *et al.*, 2019). Similarly, survival and growth of PL12 and early juvenile (0.3-0.4g) white leg shrimp was enhanced by the supply of Novacq™ at 10% inclusion level in practical and commercial feeds (figure 2; Rombenso *et al.*, 2021). Additionally, whole-body composition was not altered by Novacq™ supply.

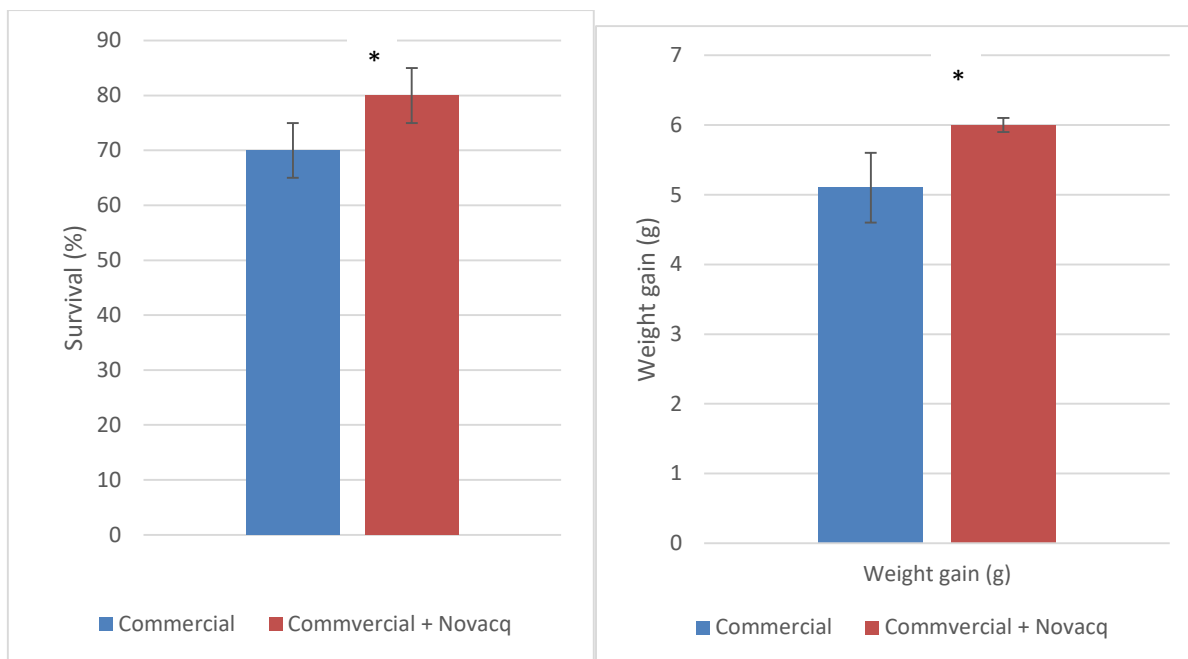


Figure 2. Survival (%) and weight gain (g) of early juvenile white lega shrimp fed commercial feeds with and without Novacq™ supplementation. * represents statistical differences.

To better understand the mode of action of Novacq™, we investigated the performance, digestibility, digestive enzyme activity, nutritional condition and gut microbiota of black tiger prawn fed commercially relevant marine-origin ingredients/additives including krill meal, krill hydrolysate, whole squid and Novacq™ at 10% inclusion, to apparent satiation or restriction (~60% of control diet satiation; Simon *et al.*, 2020). Shrimp fed Novacq™ feeds confirmed previous findings, displaying greater production performance, feed intake, feed efficiency and nutrient retention. Novacq™ appears to enhance the efficient use of nutrients by increasing the retention of protein and the catabolism of non-protein energy. Insights into shrimp physiology were obtained where protease activity in the hepatopancreas were correlated with FCR and retention of non-protein energy (Figure 3).

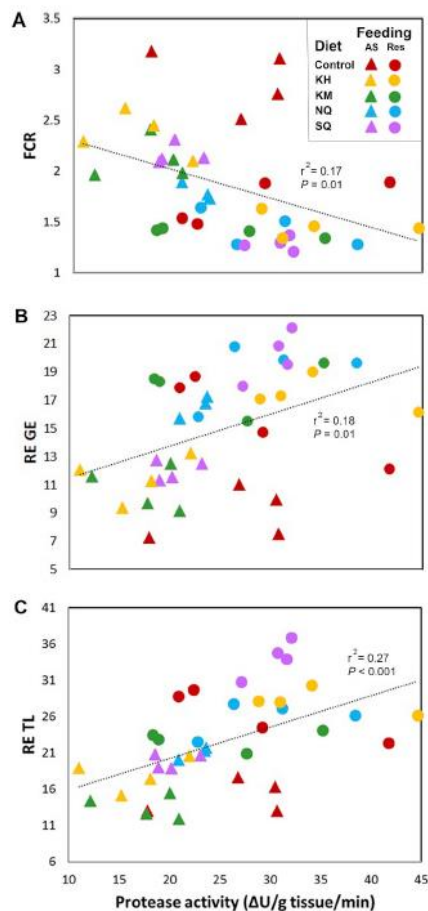


Figure 3. Significant linear relationship between protease activity in the hepatopancreas and FCR ($r^2=0.17$, $P=0.01$), RETL ($r^2=0.27$, $P < 0.001$) and REGE ($r^2=0.18$, $P=0.01$). Triangles represent satiety (AS) and circles represent restricted (Res) ration, while colours represent the Control (red), krill hydrolysate (KH, yellow), krill meal (KM, green), NovacqTM (NQ, blue) or whole squid (SQ, purple) diets, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.) Extracted from Simon *et al.*, 2020 – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734679>.

We also demonstrate the advantage of supplementing NovacqTM to promote shrimp performance in different culture conditions dominated by heterotrophic or photoautotrophic organisms, and particularly if it continues to be delivered in a diet throughout the feeding period (figure 4; Rombenso *et al.*, 2020).

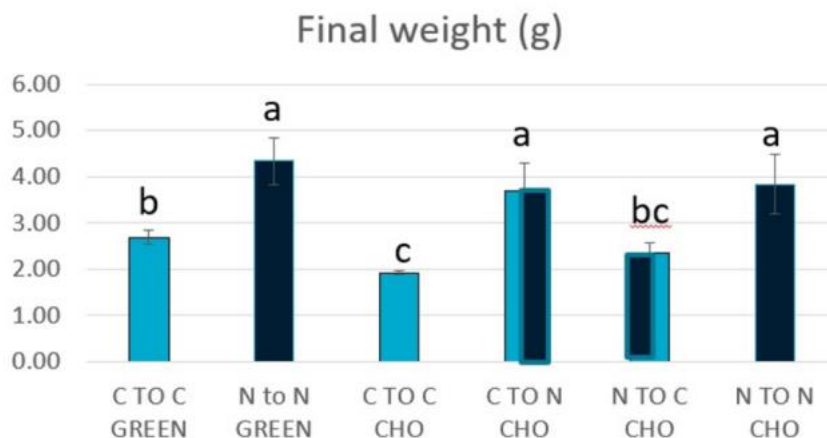


Figure 4. Individual final weight (g) of shrimp fed control (C) and/or NovacqTM (N) feeds in nursery phase under two culture conditions (Green = culture condition dominated by autotrophic organisms and CHO = culture condition dominated by heterotrophic organisms) and clearwater feeding trial for a total of 135 days (from postlarvae 19 to 2-4g) . The first letter (C or N) corresponds to the feed during nursery phase and the second to the feed in the clear water feeding trial. Extracted from Rombenso *et al.*, 2020 – <https://www.globalseafood.org/advocate/commercial-microbial-biomass-additive-evaluated-in-black-tiger-shrimp-diets/>

The findings collectively justify NovacqTM as a key strategic feed additive in shrimp (*P. monodon* and *L. vannamei*) formulations. Further information about these findings and their implications for future research on prawn nutrition will be discussed.

Organic acids

We investigated the use of organic acids individually or in combination at 1% in feeds for juvenile black tiger prawns (Rombenso *et al.*, 2020). Combination of butyrate, succinate and fumarate improved survival, feed intake, growth, and nutrient retention efficiency. Individually, butyrate appears to be the most potent organic acid followed by succinate, whereas fumarate seems to be dispensable in black tiger prawn diets.

Digestive physiology

Our focus on shrimp digestive physiology allows us to investigate the utilisation of nutritional inputs and identify factors which are important for efficient conversion of feed in shrimp. Thus,

feed and ingredients are major influential factors in this regard. Advances in feed formulations have been achieved in shrimp nutrition. However, the reliance on marine-origin ingredients (i.e. fishmeal, squid by-product meal, mussel meal, krill meal) in *P. monodon* appears to be greater than in *L. vannamei*, in which complete replacement has limited success. Accordingly, we aimed to understand the effects of key marine ingredients (the microbial biomass NovacqTM, krill meal and squid meal) on feed intake and nutrient utilisation (Truong *et al.*, 2021). Feed intake, rate of digesta travelling through the gut and post-prandial concentration of free amino acids in haemolymph varied across the tested marine ingredients.

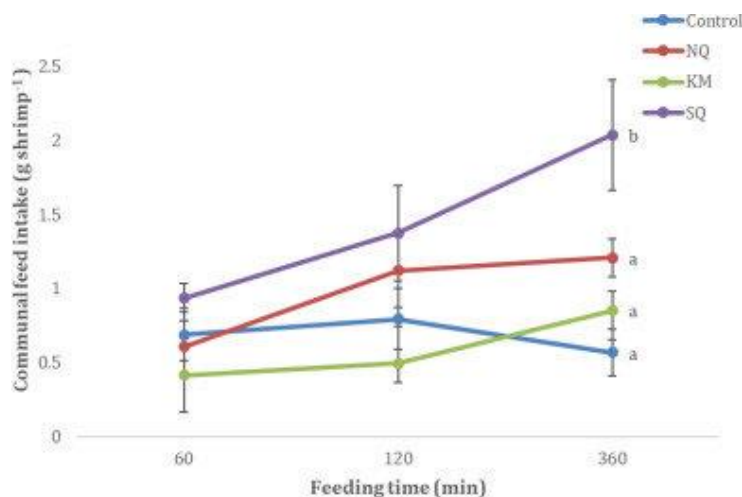


Figure 5. Communal feed intake (g/shrimp) per feeding time of shrimp fed diets containing marine-origin ingredients. Extracted from Truong *et al.*, 2021 – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736171>

This paper identified key digestive mechanisms which are likely to contribute to the enhanced growth observed when marine meals are added to shrimp feed (Simon *et al.*, 2020). Ingredients which increased feeding rate and gut transit rate, such as the microbial biomass (NovacqTM, NQ), were also shown to prolong feeding time as shown in Figure 5. This provides insights into the drivers behind feed intake and gut mobility in shrimp as well as supports the growing literature on the effectiveness of marine meals in shrimp feed.

Additionally, we examined the feeding behaviour, crystalline amino acid (CAA) leaching loss and amino acid uptake in adult *P. monodon* fed a fishmeal control and alternative terrestrial meal-based formulation enriched with CAA (Simon *et al.*, 2021). No differences in attractiveness, palatability

and apparent digestibility were noticed. However, water stability of diets differed from those supplemented with CAA resulting in sub-optimal levels of essential amino acids within 2 hours in water (figure 6). The growth implications associated with leaching losses need to be investigated, and feed management becomes more important in CAA supplementation.

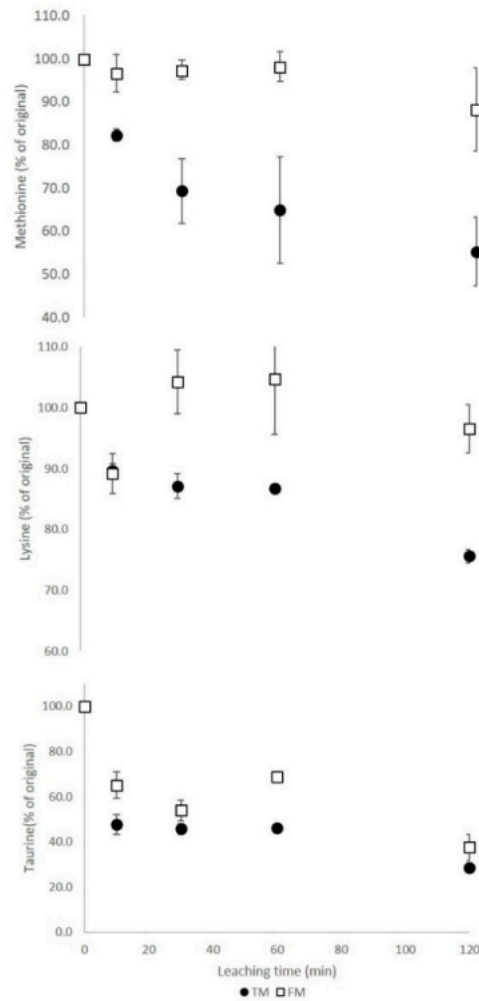


Figure 6. Leaching of amino acids (methionine, lysine and taurine) through time. Extracted from Simon *et al.*, 2021 – <https://doi.org/10.3390/ani11030847>.

Gut microbiota

The effects of diets containing high and low fishmeal levels on microbiota of different sections of the gastrointestinal tract (stomach, intestine and digesta) was investigated in black tiger prawn (Noble *et al.*, 2021). Bacterial communities were influenced by dietary treatments and different sample types. Diets largely modified the stomach and digesta communities, while intestine was less affected (Figure 7). Selection of gastrointestinal segments should be carefully considered in nutrition studies focusing on gut bacterial communities.

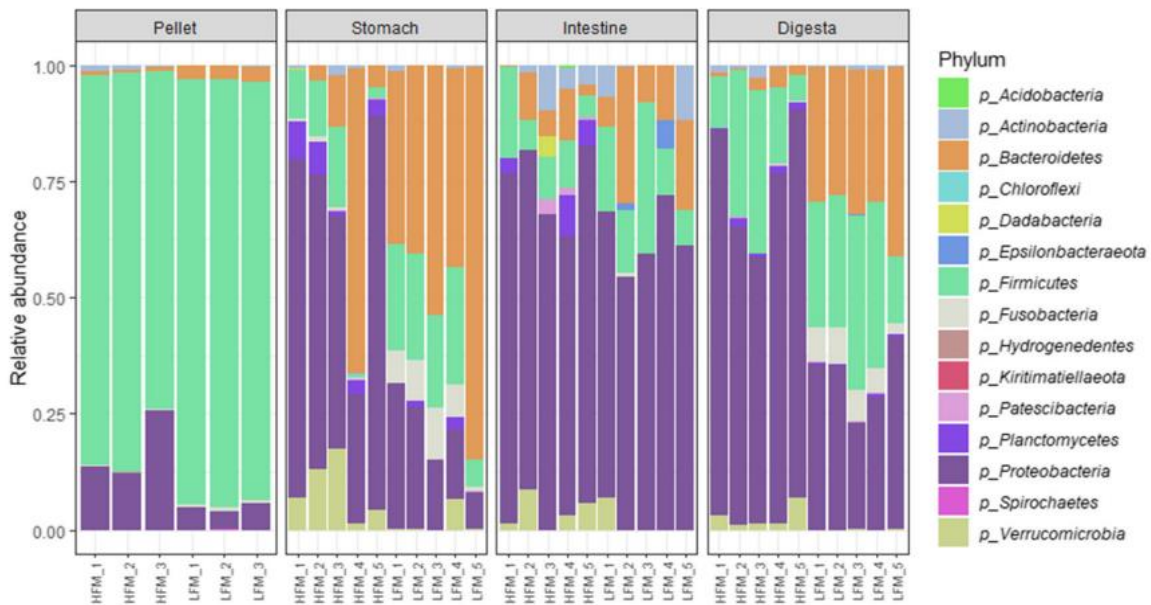


Figure 7. Taxonomy of bacterial communities of dietary treatments and gastrointestinal tract sections (stomach, intestine and digesta) of shrimp fed diets containing high or low fishmeal. Extracted from Noble *et al.*, 2021 – <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11052-6>.

Apparent digestibility and digestive physiology research

Unlike fish, where abdominal stripping is considered to be a reliable method for collecting faeces for the measurement of apparent digestibility, in shrimp, current methods rely on collection of excreted faeces by settlement. The latter is likely to result in over-estimation of apparent digestibility due to leaching of soluble nutrients from the faeces. Accordingly, we tested the efficacy of different faecal collection methods based on dissection, screening and decanting in a bucket on the apparent digestibility of commercially relevant ingredients rich in protein, lipid and starch (Truong *et al.*, 2022). Protein and amino acid apparent digestibility values were influenced by collection methods, whereas dry matter, starch and lipid were not. Traditional collection

methods (screen and bucket) over-estimated protein and total amino acids apparent digestibility due to leaching (Figure 8), suggesting standard practices for evaluating digestible protein of protein-rich ingredients in shrimp needs to be reconsidered. Dissection method provides a similar method to fish stripping that can be applied to shrimp.

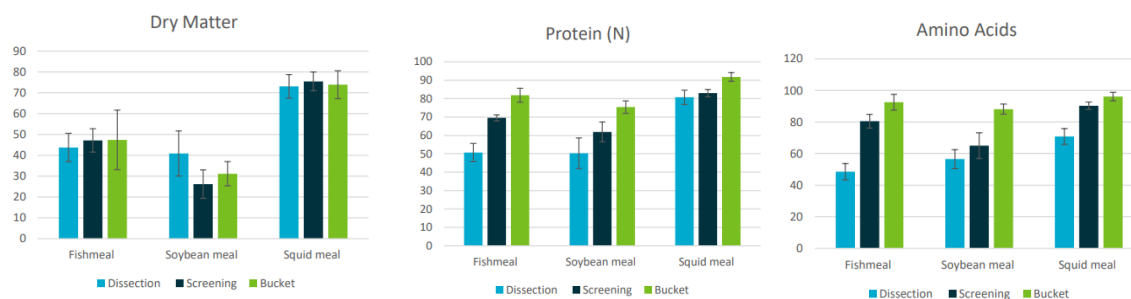


Figure 8. Dry matter, protein and amino acids apparent digestibility of protein-rich ingredients (fishmeal, soybean meal and squid meal) determined by three faecal collection methods (dissection, screening and bucket).

We also tested the assumption that nutrient absorption predominately occurs in the hepatopancreas and not in the posterior gut sections. Using the dissection method, we determined the apparent digestibility of three gastrointestinal tract regions (foregut, proximal and distal hindgut). Higher values of dry matter and protein apparent digestibility were measured in hindgut (proximal and distal) than foregut (Figure 9). Digestibility did not increase further down the hindgut. Combined, the results provide substantial evidence that the hepatopancreas is the main site of nutrient digestion and absorption in shrimp.

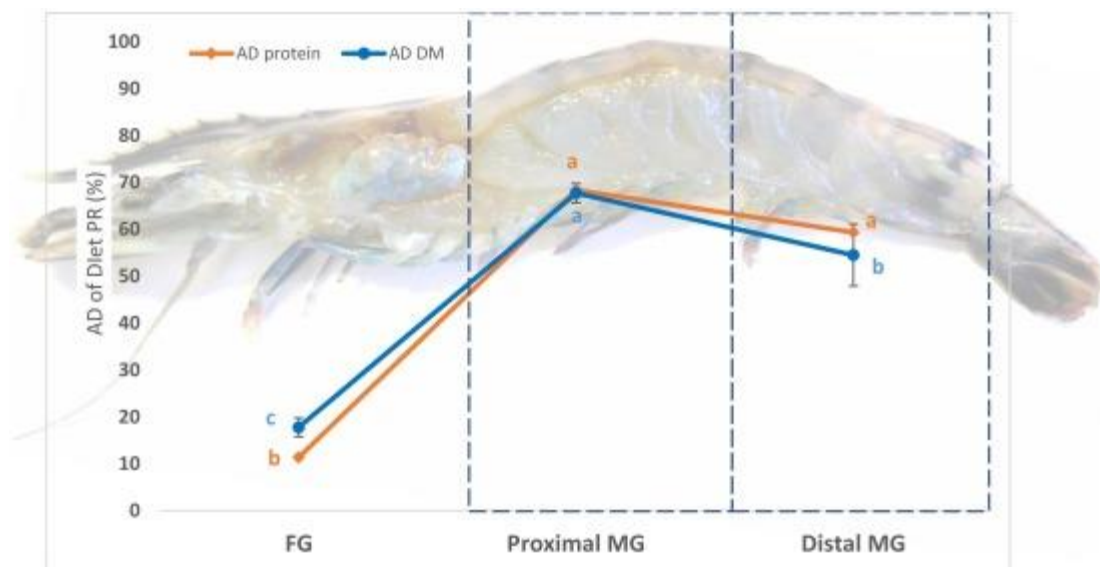


Figure 9. Dry matter and protein apparent digestibility of three regions of the gastrointestinal tract. Extracted from Truong *et al.*, 2022 – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737957>

Nutrient essentiality

Knowledge of mineral essentiality is limited in shrimp nutrition, especially for *P. monodon* (NRC 2011). We aimed to assess the importance of a large number of minerals which had or had not been assessed in shrimp previously. We adopted a novel Plackett Burman screening design to more efficiently understand the influence of twelve dietary minerals for optimal growth in *P. monodon* (Truong *et al.*, 2020). Addition of calcium:phosphorus at 1:1 ratio, magnesium, boron, manganese, selenium and zinc yielded greater weight gain, feed conversion efficiency, biomass gain and nutrient/energy retention. More specifically, boron and manganese demonstrated higher retention of crude protein, total lipids and gross energy. We also brought some insights on mineral chemical form and its effect on diet stability and bioavailability, and highlighted the need to refine mineral requirements in shrimp.

Nutrition, production system, breeding and health review

Shrimp farming is intensifying, aiming for more control and biosecurity to mitigate risks (Figure 10). Advances in nutrition and breeding linked to production systems have positively contributed to the development and adoption of intensive systems. Our recent review discusses the role of nutrition in shrimp intensification, including feed cost (relationship between prices of raw materials and shrimp, and raw materials and their respective protein content), feed quality, feeding

management, nutrient requirements (Table 1), tailored feeds, feed additives, and marine and microbial-based growth promoters (Emerenciano *et al.*, 2022). We additionally explored the links among nutrition, breeding, and health towards intensification of shrimp farming.

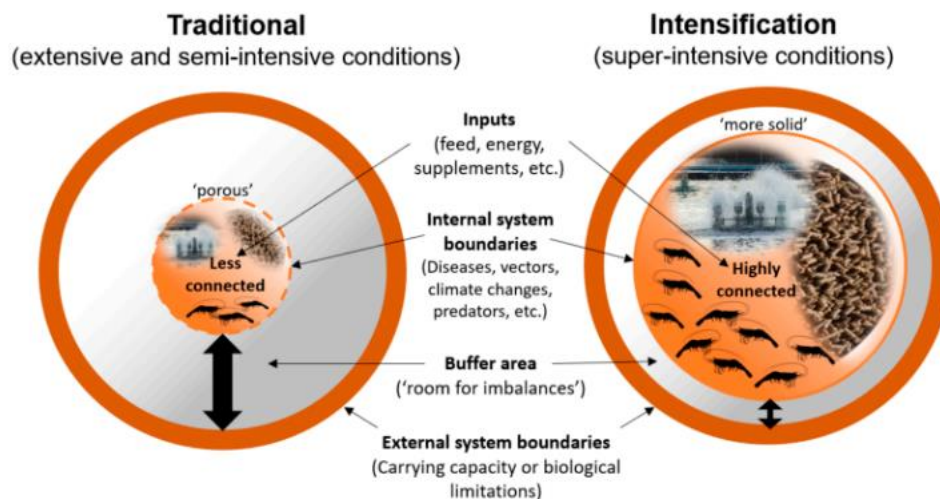


Figure 10. Comparison between traditional and intensive systems. Extracted from Emerenciano *et al.*, 2022 - <https://doi.org/10.3390/ani12030236>.

Table 1. Recommended nutrient requirements for *L. vannamei* under different production systems and intensity. Data adapted from Internation Aquaculture Feed Formulation Database

(IAFFD - <https://www.iaffd.com/>). Extracted from Emerenciano *et al.*, 2022 -

<https://doi.org/10.3390/ani12030236>

Nutrient Requirements (%)	<i>L. vannamei</i>		
	RAS	Semi-Intensive	Intensive
Crude protein	38–44	33–42	40–46
Crude lipid	9–11	7	8
Dig. energy (kJ/kg)	15,820–16,292	14,033–15,380	15,079–15,874
Amino acids (%)			
Arg	2.56–2.94	2.58–2.92	2.69–2.99
His	0.73–0.83	0.73–0.82	0.77–0.84
Ile	1.51–1.71	1.52–1.70	1.59–1.73
Leu	2.52–2.99	2.53–2.98	2.64–3.06
Lys	2.76–3.18	2.72–3.14	2.83–3.22
Met	0.97–1.11	0.98–1.11	1.01–1.13
Phe	1.74–1.97	1.76–1.96	1.83–2.00
Thr	1.31–1.56	1.31–1.54	1.37–1.58
Trp	0.34–0.39	0.34–0.39	0.36–0.39
Val	1.7–2.01	1.72–2.00	1.79–2.04
Fatty acids (%)			
Sum n-3	0.89	0.83	0.87
Sum n-6	0.6	0.6	0.6
EPA + DHA	0.71–1.01	0.67–0.94	0.69–0.98
Cholesterol	667–834	521–727	540–752
Phospholipids	1.1–1.5	1–1.4	1.1–1.4

Ongoing Shrimp research projects

Our future research will encompass more and more considerations that extend beyond nutrition in order to consider interactions with health, breeding and production systems. All these areas are interacting and need to be considered together for the research to be truly adaptable to the commercial environment—the expectation for relatively high return on investment from R&D is becoming more apparent in a post-pandemic era.

In the shrimp broodstock space, we have been investigating the key nutritional inputs of traditionally used fresh feeds, polychaetes fortification strategies, and replacement of fresh feeds with formulated moist feeds.

We are investigating the impact of dietary nutrients, specifically minerals, when rearing shrimp in systems with low water replenishment or mineral-deficient water.

We are continuing to support start-ups and small/medium enterprises by assessing the usefulness of complementary/alternative ingredients such as food waste, Greenshell mussel powder, algae-based ingredients, microbial biomass feed additives, fermented meals and Australian sourced canola meal products for shrimp feeding. These relatively under-explored raw materials are not only relevant as locally available nutrient source but also play a role in the development of functional feeds with immunomodulatory properties and some brings an important sustainability angle via therecycling of waste nutrients from other industries.

Fish nutrition:

The core of our fish nutrition research has focused on barramundi *Lates calcarifer* and Atlantic salmon *Salmo salar*. The latter represents the bulk of the aquacultured fish production in Australia (circa 70,000 tonnes) and therefore is of major research focus in Australia. Similar to shrimp nutrition, our research scope and footprint in fish nutrition is broad and focus on lipid nutrition, novel ingredients, digital technologies (near-infrared spectroscopy – NIRS), metabolism, in vitro ingredient characterisation, and linking nutrition with other science areas such as production systems and health.

Formulation optimisation

One of the biggest challenges of lipid research in fish nutrition consists of decreasing the reliance of fish oil in aquafeeds while maintaining fish survival, performance and levels of omega-3 fatty

acids (DHA and EPA) in the edible flesh. Despite decades of searching and developing alternative and complementary lipid sources, fish oil remains a cost-effective source of long-chain polyunsaturated fatty acids, mostly DHA, EPA and ARA. We wrote a piece on the current main challenges around fish oil and lipid sources in fish nutrition, describing and discussing strategies the aquafeed industry can take (Rombenso *et al.*, 2021). We introduced and discussed in depth the pros and cons, and future perspectives of an approach that has received little attention the “omega-3 sparing effect” – phenomenon based on saturated fatty acids-rich feeds that won’t proportionally accumulate in tissue resulting in similar or higher omega-3 fatty acids deposition, metabolically sparing the omega-3 fatty acids (Rombenso *et al.*, 2021).

Digestibility of astaxanthin, the most commonly used carotenoid pigment in salmonids is not consistent and sub-optimal. We compared the digestibility of synthetic or algal carotenoids in diets containing different lipid sources such as poultry oil, beef tallow or canola oil, as well as feed intake and diet palatability (Courtot *et al.*, 2022). Algal carotenoids were more digestible than the synthetic product. Fatty acid composition of diets influenced astaxanthin apparent digestibility with those rich in monounsaturated fatty acids, mainly 18:1n-9, resulting higher astaxanthin apparent digestibility than those rich in saturated fatty acids (Figure 11). No differences in intake or palatability were observed across the dietary treatments. These findings suggest the relevance of tailoring dietary fatty acid composition to water temperature and the respective influence on astaxanthin digestibility and the suitability of algal carotenoids as natural pigments in salmon feeds.

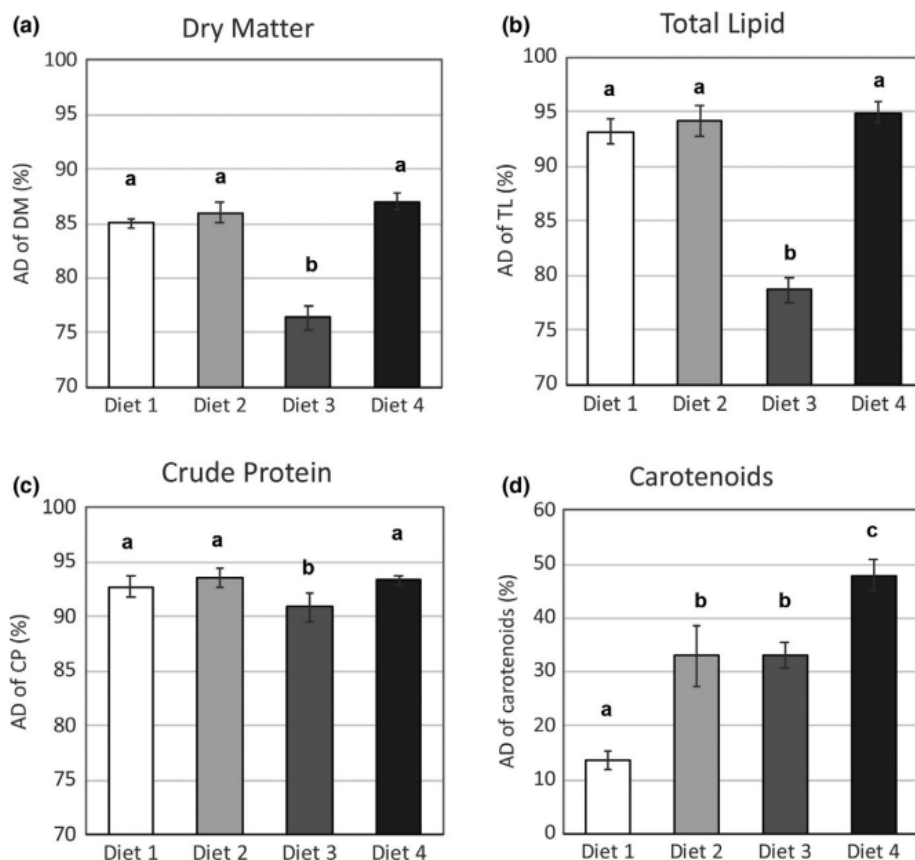


Figure 11. Apparent digestibility of dry matter (a), total lipid (b), crude protein (c) and carotenoids (d) of juvenile Atlantic salmon fed diets containing algal or synthetic astaxanthin with distinct lipid sources. Diet 1 = poultry oil with synthetic astaxanthin, Diet 2 = poultry oil with algal astaxanthin, Diet 3 = beef tallow with algal astaxanthin, and Diet 4 = canola oil with algal astaxanthin. Extracted from Courtot *et al.*, 2022 - <https://doi.org/10.1111/are.15753>.

Heterotrophic cultivation of thraustochytrids is a promising alternative to sustainably produce the health promoters omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. CSIRO thraustochytrids strains can contain high DHA of as much as 14 g/L (40% total fatty acids, cell dry weight at 69 h). We investigated the potential of thraustochytrid whole cell biomass to replace fish oil in Atlantic salmon feeds (Chang *et al.*, 2020). No negative effects in production performance and whole-body total lipid and fatty acid composition were observed (Figure 12). The Australian thraustochytrid strains grown heterotrophically appears to be suitable for aquafeeds, although further on-farm research is needed to validate these findings.

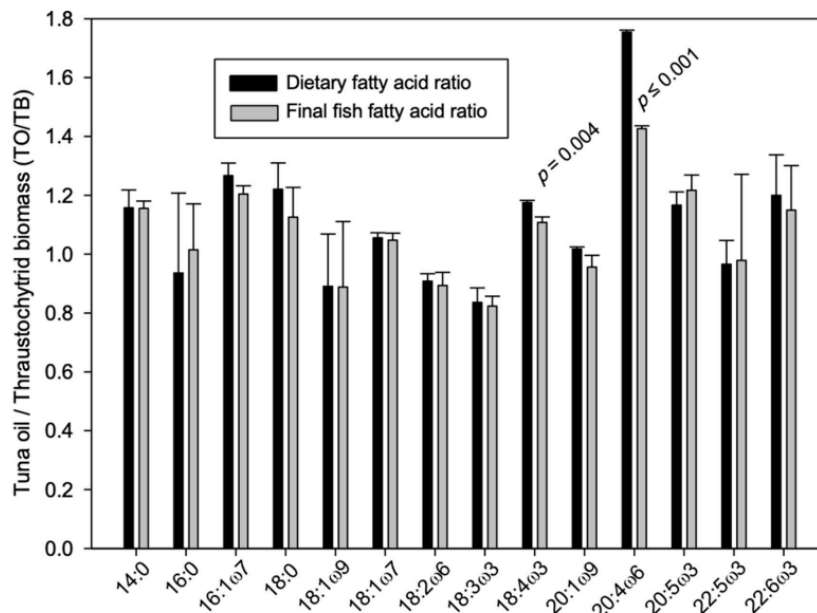


Figure 12. Dietary and final fish fatty acid ratio (fish oil/thraustochytrids whole cell biomass). Extracted from Chang *et al.*, 2020 - <https://doi.org/10.3390/jmse8030207>

Long-chain n-3 rich oils from crops GM with algal genes are also a promising new sources for the industry. We engaged with NOFIMA and Nuseed in a collaboration assessing the use of a newly developed n-3 canola oil (DHA-CA) in diets of Atlantic salmon fingerlings in freshwater (Bente *et al.*, 2019). The DHA-CA oil has high proportions of the n-3 fatty acids (FA) 18: 3n-3 and DHA and lower proportions of n-6 FA than conventional plant oils.

Two feeding trials were conducted to evaluate effects of two dietary levels of DHA-CA compared with two dietary levels of FO at two water temperatures, in Australia (16°C) and Norway (12°C) with respective fish genetics and local ingredients used in comparable formulations. Fish increased their weight approximately 20-fold at 16°C and 12-fold at 12°C during the experimental periods, with equal growth in salmon fed the FO diets compared with DHA-CA diets. Salmon fed DHA-CA diets had approximately the same EPA+DHA content in whole body as salmon fed FO diets. Gene expression, lipid composition and oxidative stress-related enzyme activities showed only minor differences between the dietary groups, and the effects were mostly a result of dietary oil level, rather than the oil source. The results demonstrated that DHA-CA is a safe and effective replacement for FO in diets of Atlantic salmon during the sensitive fingerling life-stage (Bente *et al.*, 2019).

Table 2. Growth and survival data. Extracted from Bente *et al.*, 2019 - <https://doi.org/10.1017/S0007114519002356>

	16°C water temperature trial								ANOVA, P	12°C water temperature trial								ANOVA, P
	Low FO		High FO		Low DHA-CA		High DHA-CA			Low FO		High FO		Low DHA-CA		High DHA-CA		
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
Body weight (g)																		
Day 0	0.83	0.01	0.84	0.02	0.86	0.03	0.83	0.02	0.74	2.04	0.09	2.16	0.04	2.08	0.04	2.05	0.01	0.46
Period 1	4.63	0.12	4.49	0.06	4.49	0.14	4.44	0.13	0.68	4.47	0.19	4.79	0.07	4.52	0.10	4.38	0.03	0.14
Period 2	10.35	0.08	10.14	0.28	10.17	0.09	9.94	0.20	0.48	6.82	0.29	7.33	0.10	6.81	0.16	6.67	0.03	0.11
Period 3	15.49	0.47	15.29	0.31	16.22	0.77	15.25	0.22	0.47	23.82	0.94	25.41	0.80	23.28	0.62	23.74	1.02	0.38
SGR (%/d)																		
Period 1	5.04	0.09	4.94	0.02	4.90	0.04	4.94	0.03	0.18	2.95	0.03	3.01	0.12	2.93	0.07	2.87	0.03	0.64
Period 2	3.66	0.08	3.72	0.05	3.73	0.10	3.67	0.06	0.90	3.05	0.03	3.08	0.03	2.97	0.07	3.03	0.08	0.57
Period 3	2.87	0.26	2.91	0.12	3.18	0.20	3.06	0.04	0.65	3.02	0.03	3.00	0.05	2.97	0.01	3.07	0.11	0.73
SGR total	4.17	0.04	4.20	0.02	4.20	0.02	4.16	0.02	0.72	3.01	0.01	3.02	0.07	2.96	0.02	3.00	0.04	0.76
TGC total	1.36	0.02	1.35	0.01	1.38	0.027	1.35	0.00	0.73	1.59	0.02	1.63	0.04	1.57	0.02	1.59	0.04	0.50
Survival (%)	99.7	0.40	99.0	0.40	98.0	0.49	99.3	0.40	0.14	97.2	1.2	97.0	1.5	96.7	1.4	93.7	3.0	0.55

FO, fish oil; DHA-CA, n-3-rich modified canola oil; SGR, specific growth rate; TGC, thermal growth coefficient.

* The period from 0 to 34 d is denoted Period 1, from 34 to 56 d is denoted Period 2 and from d56 to 70 d is denoted Period 3 in the 16°C trial. The period from 0 to 27 d is denoted Period 1, from 27 to 41 d is denoted Period 2 and from d41 to 83 d is denoted Period 3 in the 12°C trial.

Table 3. Whole body fatty acid composition (% of total). Extracted from Bente *et al.*, 2019 - -

<https://doi.org/10.1017/S0007114519002356>

	16°C water temperature trial								ANOVA, P	12°C water temperature trial								ANOVA, P
	Low FO		High FO		Low DHA-CA		High DHA-CA			Low FO		High FO		Low DHA-CA		High DHA-CA		
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
14 : 0	3.7 ^a	0.02	4.05 ^b	0.03	3.4 ^c	0.03	3.5 ^c	0.02	<0.001	3.4 ^b	0.03	3.9 ^a	0.09	3.0 ^c	0.03	3.0 ^c	0.03	<0.0001
16 : 0	17.0 ^a	0.13	18.5 ^b	0.17	15.8 ^c	0.10	16.0 ^c	0.12	<0.0001	13.0 ^b	0.03	13.7 ^a	0.03	12.2 ^c	0.23	12.1 ^c	0.03	<0.0001
18 : 0	4.3 ^a	0.05	4.7 ^b	0.01	4.2 ^a	0.01	4.3 ^a	0.05	<0.001	2.9	0.03	2.9	0.03	2.9	0.03	3.0	0.03	0.44
20 : 0	0.3 ^a	0.00	0.3 ^b	0.00	0.3 ^a	0.00	0.3 ^a	0.00	<0.001	0.3	0.00	0.3	0.03	0.3	0.03	0.3	0.00	0.33
Σ SFA*	26.3 ^a	0.18	28.8 ^b	0.22	24.8 ^c	0.20	25.1 ^c	0.13	<0.0001	20.0 ^b	0.06	21.3 ^a	0.13	18.9 ^c	0.30	19.0 ^c	0.07	<0.0001
16 : 1n-7	4.0 ^a	0.05	4.5 ^b	0.03	3.7 ^c	0.03	3.7 ^c	0.01	<0.0001	3.2 ^b	0.15	3.6 ^a	0.10	2.3 ^c	0.09	2.2 ^c	0.00	<0.0001
18 : 1n-7	3.4 ^a	0.01	3.4 ^a	0.01	3.3 ^b	0.02	3.3 ^b	0.01	<0.01	3.7 ^c	0.07	3.6 ^c	0.00	4.0 ^b	0.03	4.3 ^a	0.03	<0.0001
18 : 1n-9	34.9 ^a	0.16	30.3 ^b	0.20	34.0 ^c	0.07	28.2 ^d	0.09	<0.0001	31.6 ^a	0.20	26.7 ^b	0.20	31.3 ^a	0.12	26.2 ^b	0.07	<0.0001
20 : 1n-9	2.4 ^a	0.01	2.2 ^b	0.03	2.3 ^c	0.03	2.1 ^d	0.00	<0.0001	6.3 ^b	0.06	6.8 ^a	0.03	5.6 ^c	0.03	5.4 ^d	0.00	<0.0001
22 : 1n-11	nd		nd		nd		nd			6.1 ^a	0.06	6.5 ^a	0.24	4.8 ^b	0.24	5.3 ^b	0.06	0.0005
Σ MUFA†	45.7 ^a	0.17	41.4	0.252	44.2 ^c	0.11	38.1 ^d	0.09	<0.0001	54.0 ^a	0.23	51.3 ^b	0.26	51.9 ^b	0.18	47.8 ^c	0.09	<0.0001
18 : 2n-6	6.4 ^a	0.05	5.7 ^b	0.03	6.4 ^a	0.03	5.9 ^b	0.07	<0.0001	5.4 ^a	0.06	4.5 ^c	0.00	5.5 ^a	0.10	4.9 ^b	0.00	<0.0001
20 : 4n-6	0.5 ^a	0.01	0.6 ^b	0.01	0.3 ^c	0.01	0.3 ^c	0.01	<0.0001	0.3	0.00	0.3	0.00	0.3	0.00	0.3	0.00	
Σ n-6‡	7.8 ^a	0.06	7.3 ^b	0.11	7.6 ^a	0.03	7.1 ^b	0.11	<0.0001	6.8 ^a	0.03	5.9 ^c	0.09	6.9 ^a	0.09	6.4 ^b	0.03	<0.0001
18 : 3n-3	3.1 ^a	0.05	2.6 ^b	0.06	5.9 ^c	0.02	8.5 ^d	0.12	<0.0001	3.2 ^c	0.06	2.6 ^d	0.00	5.7 ^b	0.10	7.8 ^a	0.03	<0.0001
18 : 4n-3	0.9 ^a	0.01	0.9 ^a	0.01	1.3 ^b	0.01	1.8 ^c	0.03	<0.0001	nd		nd		nd		nd		
20 : 3n-3	0.2 ^a	0.00	0.2 ^b	0.00	0.5 ^c	0.00	0.7 ^d	0.00	<0.0001	0.2 ^b	0.00	0.2 ^b	0.00	0.5 ^a	0.03	0.6 ^a	0.12	0.003
20 : 4n-3	0.5 ^a	0.00	0.5 ^a	0.01	0.8 ^b	0.00	1.2 ^c	0.00	<0.001	0.6 ^b	0.09	0.8 ^a	0.01	0.6 ^b	0.01	0.6 ^b	0.00	0.02
20 : 5n-3	3.0 ^a	0.05	3.2 ^b	0.03	2.9 ^a	0.02	3.2 ^c	0.04	<0.0001	2.8 ^b	0.00	3.5 ^a	0.03	2.4 ^c	0.00	2.5 ^c	0.03	<0.0001
22 : 5n-3	1.4	0.00	1.5	0.02	1.2	0.21	1.4	0.23	0.55	0.9 ^b	0.03	1.2 ^a	0.00	0.9 ^b	0.03	0.9 ^b	0.03	0.0002
22 : 6n-3	11.0 ^a	0.16	13.1 ^b	0.15	10.7 ^a	0.05	12.8 ^b	0.10	<0.0001	9.7 ^d	0.19	10.8 ^b	0.07	10.4 ^c	0.12	12.2 ^a	0.03	<0.0001
Σ n-3	20.5 ^a	0.26	22.6 ^b	0.22	23.7 ^b	0.23	29.9 ^c	0.09	<0.0001	17.6 ^d	0.15	19.3 ^c	0.20	20.6 ^b	0.23	24.7 ^a	0.17	<0.0001
n-6:n-3	0.38 ^a	0.00	0.32 ^b	0.00	0.32 ^b	0.00	0.24 ^c	0.00	<0.001	0.38 ^a	0.00	0.31 ^c	0.00	0.33 ^b	0.01	0.26 ^d	0.00	<0.0001
EPA+DHA	17.1 ^a	0.25	20.1 ^b	0.20	16.6 ^a	0.08	19.6 ^b	0.15	<0.0001	12.5 ^b	0.19	14.3 ^a	0.10	12.8 ^b	0.12	14.7 ^a	0.06	<0.0001

FO, fish oil; DHA-CA, n-3-rich modified canola oil; nd, not determined.
^{a,b,c,d} Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different (P < 0.05).
 * Includes 15 : 0, 17 : 0, 19 : 0 and 21 : 0.
 † Includes 17 : 1, 20 : 1n-7, 20 : 1n-11, 22 : 1n-9 and 24 : 1n-9.
 ‡ Includes 18 : 3n-6, 20 : 2n-6, 20 : 3n-6 and 22 : 4n-6.

Novel ingredients

We investigated the intestinal health of juvenile Atlantic salmon fed CSIRO engineered soybean genotypes with reduced antinutritional factors known to cause gut irritation, including lipoxygenases and oligosaccharides (Rombenso *et al.*, 2021). This soybean meal also contained a more desirable glycinin profile. High levels of dietary SBM resulted in mild intestinal inflammation indicating enteritis progression. Speciality soybean types lacking lipoxygenases, oligosaccharides and altered glycinin profile did not improve intestinal health suggesting these antinutrients are not drivers of the intestinal inflammatory process in this species (Figure 13; Table 4). No additional benefits in terms of production performance or blood biochemistry were noticed in the speciality soybean types compared to the traditional soybean. The present findings demonstrates a targeted genomic approach to modifying soybean meals for aquaculture feeding. Clearly, more research in this space is required to identifying the most impactful antinutritional factors impacting salmon gut enteritis.

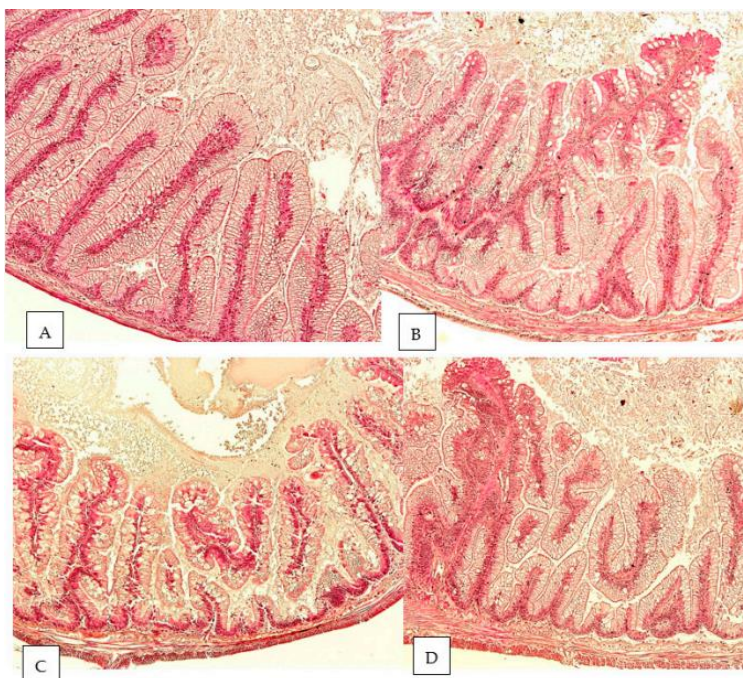


Figure 13. Histology of distal intestine of juvenile Atlantic salmon illustrating mild intestinal inflammation. A = control fishmeal diet, B = standard soybean meal, C = soybean meal absents of seed lipoxygenases and homozygous for the rs2 allele conditioning and near absent of seed raffinose and stachyose, and D = soybean meal conditioning null 11sA4 and 11sA5 globulins of glycinin.

Table 4. Summary of the main findings and parameters investigated of soybean meal-induced enteritis studies with Atlantic salmon. Extracted from Rombenso *et al.*, 2021 - <https://doi.org/10.3390/app11199327>.

Growth Impairment	Feed Intake	Level of DI Inflammation	Enzymes	Time Sampling (Days)	Tissues Analyzed	Parameters	Ref.
SBM yes SPC no		SBM +++			PI and DI	MSA/LSC, ESA/LSC, LPSA/LSC,	[16]
Yes		+++		2, 7, 14 and 21	DI	ESA/LPSA, GC/E, LM	[17]
		++	5' N, Mg-ATPase, ALP, ACP, NSE, LAP, AAP	21	MI and DI	MF	[3]
Low SBM no High SBM yes	No changes	+, ++ and +++	ALP, LAP, maltase, isomaltase, lactase and sucrose		MI and DI	MF, SNV, LP, leycocyte	[4]
		+, ++ and +++			DI	MF, SNV, LP, CT	[28]
		++ and +++			DI	MF, GC, LP SNV, EG, SM	[29]
		++ and +++			DI	MF, GC, LP SNV, EG, SM	[10]
		+, ++, and +++	Pancreatic (trypsin, chymotrypsin, elastase, and lipase), chyme (LAP), brush border membrane (LAP and maltase)	0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 17, and 21	PI, MI and DI		[30]
		+, ++, and +++		1, 2, 3, 5 and 7	DI		[31]
Low saponins no Mid-high saponins yes	Low saponins no Mid-high saponins yes	+, ++, and +++	Trypsin activity, bile acids, brush border membrane enzyme activity (LAP)		PI and DI	MF, LP, enterocyte vacuolization, GC, nucleos position within the enterocytes	[20]
		+++			DI	MF, SNV, LP, CT	[32]
		+, ++, and +++		7, 14 and 21	DI	Inflammation score, SM and microbiome	[18]
No	No changes				DI	MF, GC, LP, SNV, EG, SM	[33]
No	No changes	+ and ++	Brush border LAP, trypsin activity		DI	MF, SNV, SM, LP, microbiota, gene expression	[9]
		+ and ++			PI, MI and DI	MF, SNV, LP, CT,	[19]
SBM 17 no SBM 34 yes						Body composition and blood biochemistry	[27]
Yes	No changes	++ and +++			DI	MF, SNV, LP, CT,	[34]

Ref. = references; Level of enteritis: + mild, ++ moderate, and +++ high; 5' N = 5'-nucleotidase; Mg-ATPase = Mg²⁺ dependent adenosine triphosphatase; ALP = alkaline phosphatase; ACP = acid phosphatase; NSE = non-specific esterase; LAP = leucine aminopeptidase, AAP = alanine aminopeptidase; PI = proximal intestine; MI = mid-intestine; DI = distal intestine; MF = mucosal fold; MSA = mucosal surface area; LSC = length mucosal stratum compactum; ESA = epithelial surface area; LPSA = lamina propria surface area; GC = goblet cells; E = 100 um epithelium; LM = length microvilli; SNV = supranuclear vacuoles; LP = lamina propria; EG = eosinophilic granulocytes; CT = connective tissue; SM = sub-epithelial mucosa.

In Australia, cowpea is a significant rotation crop which demonstrated promising value as an emerging plant-based protein for aquaculture markets (Bell *et al.*, 2021). However it is severely underutilised. Therefore we reviewed cowpea-related aquaculture nutrition research discussing its ingredient characteristics, nutritional composition and value, and potential strategies to be used in aquafeeds (Tables 5 and 6).

Table 5. Protein, lysine and methionine content and price of various protein ingredients.

Extracted from Bell *et al.*, 2021 - <https://doi.org/10.3390/agronomy11081654>.

	Protein (%)	Lysine (%)	Methionine (%)	Price of Commodity (USD/MT-2020–2021) ^{e,f}
Fishmeal (herring) ^a	72	7.30	2.20	1500
Soybean meal ^a	44	2.83	0.61	~440
Soy protein concentrate ^a	64	3.93	0.81	~565
Soy protein isolate ^a	81	3.02	1.15	~1000
Canola meal solvent extracted ^a	38	2.02	0.77	~400
Canola protein concentrate ^a	69	3.10	1.26	-
Cottonseed meal solvent extracted ^a	42	1.60	0.58	178
Sunflower meal solvent extracted ^a	32	1.20	0.82	~300–500
Lupin meal ^a	30	1.54	0.27	~80–210
Wheat flour ^a	12	0.58	0.19	~240
Barley whole grain ^a	11	0.53	0.18	~80–120
Dehulled cowpea meal ^b	21.3–25.6	7.0–7.5	1.4–2.2	~360
Cowpea protein isolate ^{c,d}	75 ^c	6.8 ^d	1.4 ^d	-

Table 6. Summary of cowpea-related aquaculture research. Extracted from Bell *et al.*, 2021 - <https://doi.org/10.3390/agronomy11081654>.

Aquaculture species		Cowpea		Experimental design		
Common name	Scientific name	Scientific name - Type	Formulaion inclusion level (%)	Design	Major findings	Reference
Black tiger prawn	<i>Penaeus monodon</i>	<i>V. unguiculata</i> - Whole	29.5	D and GT	Dehulling increased the nutritional value of cowpea	[50]
		<i>V. unguiculata</i> - Dehulled	24.68			
Black tiger prawn	<i>Penaeus monodon</i>	<i>V. unguiculata</i> - Whole	20	GT	Cowpea suitable at 20% contributing to low cost formulation	[51]
Whiteleg shrimp	<i>Litopenaeus vannamei</i>	<i>V. unguiculata</i> - Whole	15	GT	Cooking and extruding increased the nutritional value of cowpea	[52]
		<i>V. unguiculata</i> - Dehulled	15			
		<i>V. unguiculata</i> - Cooked	15			
		<i>V. unguiculata</i> - Germinated	15			
		<i>V. unguiculata</i> - Extruded	15			
Giant freshwater prawn	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	<i>V. unguiculata</i> - Whole	15, 30, 45, and 60	FM replacement	Cowpea can replace 30-45% of FM without impairing performance	[62]
Grouper	<i>Epinephelus coioides</i>	<i>V. unguiculata</i> - Whole	30 (D) 20.5 (GT)	ID and GT	Cowpea can be included up to 20.5% without adverse growth effects	[54]
Indian carps - mrigal and rohu	<i>Cirrhinus mrigala</i> and <i>Labeo rohita</i>	<i>V. unguiculata</i> - Whole	100	D and GT	Cowpea was the least performing ingredient compared to soybean and mung bean	[48]
		<i>V. unguiculata</i> - Hydrothermally processed	100			
Nile tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>V. catianguensis</i> - Whole	10, 16, 18, 30, 32, 40, and 50	FM replacement with different dietary protein	Cowpea can replace up to 20-33% FM without impairing performance	[53]
Nile tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>V. unguiculata</i> - Whole	9, 18, 28, 37, 83 35	FM replacement	Cowpea can be added up to 20% without adverse effects. Processing treatments improve the nutritional value of cowpea, however increase cost	[49]
		Heat treated (48C, dry heat)	33			
		Heat treated (70C, dry heat)	33			
		Heat treated (119C, wet heat)	31			
		Dehulled treated (48C, dry heat)	33			
		Dehulled treated (70C, dry heat)	33			
		Dehulled treated (119C, wet heat)	32			
Nile tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>V. unguiculata</i> - Cowpea protein concentrate	5, 10, 15, 20, and 25	FM replacement	Highest growth with 20-30% FM replacement and best protein efficiency at 40%	[61]

D: digestibility, ID: in-vitro digestibility, GT: growth trial, FM: fishmeal.

Another novel raw material is insect meal but unlike cowpea, its use in aquafeeds has been more deeply investigated and reviewed. On-farm trials with Atlantic salmon and other fish species have been done and some feed mills seem to be keen in adopting it as an ingredient once its production reaches the volumes required. As part of the growing literature in this space we published a chapter (introductory reading to academic and private sector) discussing the benefits of insects in animal nutrition, describing and discussing the nutritional aspects of different insect meals, some practical developments on aquatic nutrition and constraints on insect use and its future perspective (Freccia *et al.*, 2020).

Digital technologies for nutrition: Near-infrared spectroscopy (NIRS)

Near-infrared spectroscopy (NIRS) consists of a non-invasive technique that provides rapid information on a range of chemical and physical properties of scanned samples. In the Aquafeed industry, it is used widely to predict the proximate composition of ingredients and resulting diets. We investigated the NIRS ability to predict the dietary proximate composition and starch cook of various species-specific aquafeeds, two of the most relevant characteristics and properties (Bourne *et al.*, 2021). Aquafeed samples from various studies were analysed (Table 7). NIRS models were successfully developed with high R^2 values, low standard error of cross-validation and robust residual predictive deviation (Table 8). Our findings suggest the suitability of NIRS to rapidly and accurately predict proximate composition and starch cook of various aquafeeds. Similar approaches for chemical composition, including proximate composition, of raw materials are routine in feed mills, however calibrations like the one proposed are not as commonly adopted and would promote cost and operational efficiencies by monitoring quality control as well as the deployment of those technologies at farms to cross-check on feed attributes after storage

Table 7. Aquafeed data set used for NIRS model development. Adapted from Bourne *et al.*, 2021 – <https://doi.org/10.1177/0967033521999116>

# samples	Species	Dry matter (%)	Ash (%)	Total Lipid (%)	Crude protein (%)	Gross Energy (MJ/kg)
5	Abalone	90-95	5-9	3-4	30-38	17-18
28	Barramundi	88-98	5-16	6-21	41-61	17-23
8	Salmon	94-97	12-15	16-18	57-60	21-22
17	Kingfish	93-98	10-12	13-18	45-52	21-23
43	Prawn	92-97	4-11	5-12	36-59	19-22
2	Red claw	92-95	6-8	2-5	30-35	18-19
15	Lobster	96-98	11-12	12-14	63-64	21-22
118	All	88-98	4-16	2-21	30-64	17-23

Table 8. NIRS models outputs. Adapted from Bourne *et al.*, 2021 – <https://doi.org/10.1177/0967033521999116>

Component	PCs	R ² CV	SECV	RPD	RER
Dry matter	8	0.78	0.89	10.9	66.7
Ash	13	0.9	1.09	9	55.4
Total lipid	5	0.95	0.85	9.2	56.3
Crude protein	9	0.96	1.9	4.6	28.3
Gross energy	5	0.9	0.5	15.6	95.9
Starch cook	10	0.87	7.77	1.2	7.2
Starch gelatinised via steaming	5	0.93	5.89	1.8	11.2
Starch damaged via extrusion	9	0.92	4.77	1.9	11.5

*PCs = number of principal components used for model generation; R²CV = coefficient of determination in cross validation; SECV = standard error of cross validation; RPD = ratio of performance deviation; RER = range error ratio.

In another NIRS study, we investigated the suitability of NIRS in predicting diet apparent digestibility, the composition of diets and faeces, and digestibility marker (Simon *et al.*, 2022). NIRS models were developed and validated as part of a case-study investigating the accuracy of apparent digestibility results based on a range of prediction scenarios. Successful predictions for most nutrients were achieved for diets and faeces (Tables 9 and 10), except for yttrium oxide (digestibility marker) and a few micronutrients. We demonstrated the suitability of NIRS to assist in calculating apparent digestibility of nutrients in diets by predicting dietary and faecal composition of most nutrients, except for the digestibility marker, which at this stage still needs to be chemically analysed for accuracy. This approach reduces the number of samples to be chemically analysed, has welfare implications and bring opportunities in fish nutrition. Follow up research is planned to predict endogenous digestibility markers that may have a greater capacity for NIRS determination.

Table 9. NIRS models outputs. Adapted from Simon *et al.*, 2022 –

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737624>

Component	PCs	R ² CV	SECV	RPD	RER
Diet composition	5-14	0.6-0.9	1-119	1-3	3-19
Faeces composition	5-15	0.6-0.9	1.-342	2-4	8-16

*PCs = number of principal components used for model generation; R²CV = coefficient of determination in cross validation; SECV = standard error of cross validation; RPD = ratio of performance deviation; RER = range error ratio.

Table 10. Successful NIRS models outputs. Adapted from Simon *et al.*, 2022 –

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737624>

Component	Nutrients
Diet composition	Dry matter, ash, crude protein, total lipid, gross energy and total amino acids
Faeces composition	Crude protein, total lipid, gross energy, total amino acids, methionine and lysine

Nutrition and production system

In a recent book “Biology and Aquaculture of Tilapia”, we published a chapter “Biofloc technology (BFT) in tilapia culture” where we introduce, summarise the literature and briefly discuss the relationships between nutrition and BFT for tilapia, including topics such as composition of flocs, nutrient requirements, role of alternative ingredients, feed formulations, and feed management (Emerenciano *et al.*, 2021).

Metabolism

Fish is generally very efficient in acquiring energy from protein, which is not different for barramundi. In this context, we investigated the metabolic effects of two diets varying the proportions of digestible protein and starch energy using metabolic tracers. Our findings highlight a unique series of specific hepatic regulatory mechanisms of barramundi to deal with dietary carbohydrates and provide valuable insights to nutritionists.

Ongoing research projects

Our ongoing research has focused on circularity using food waste as aquafeed ingredients and in vitro characterisation of pro- and anti-inflammatory properties of insect meals and other ingredients/additives. We are also working on the development of novel ingredients via pre-processing techniques.

Conclusion

The bulk of R&D related to the illustrated publications was done before the pandemic. However, we managed to finalise them (e.g. analytical work, data analysis and writing) using part of the time “gained” by the uncontrolled changes (e.g. projects and opportunities put on hold, limited access to facilities, etc). The ongoing research projects briefly discussed have been done throughout these challenging times.

We have learned a few lessons so far that could be summarised in (1) utilising technology and more efficient designs to gain more value from samples or data; (2) emphasis on focusing on research areas that can more effectively generate impact for the broad benefit of the Aquaculture industry; (3) even in times where travel is restricted, collaboration and exchange of ideas through online platforms was ongoing and prevented repeating particular published or planned studies; (4) balancing several research horizons and areas with results being able to be applied straight away commercially (H1) but also longer term improvement in

methodologies (H2-H3) which can assist the aquaculture industry in responding to present and future challenges.

References

- Bell, L.W., James, A.T., Augustin, M.A., **Rombenso, A.**, Blyth, D., **Simon, C.**, Higgins, T.J.V., & Barrero, J.M. (2021). A niche for cowpea in sub-tropical Australia? *Agronomy*, 11, 1654.
- Ruyter, B., Sissener, N.H., Ostbye, T-K., **Simon, C.J.**, Krasnov, A., Bou, M., Sanden, M., Nichols, P.D., Lutfi, E., & Berge, G.M. (2019). n-3 canola oil effectively replaces fish oil as a new safe dietary source of DHA in feed for juvenile Atlantic salmon. *British Journal of Nutrition*, 122(12)- 1329-1245.
- Bourne, N., Blyth, D., & **Simon, C.** (2021). Rapid prediction of chemical composition and degree of starch cook of multi-species aquafeeds by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 29(4), 216-225.
- Chang, K.J.L., Parrish, C.C., **Simon, C.J.**, Reville, A.T., & Nichols, P.D. (2020). Feeding whole thraustochytrid biomass to cultured Atlantic salmon (*Salmo salar*) fingerlings: culture performance and fatty acid incorporation. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8, 207.
- Courtot, E., Musson, D., Stratford, C., Blyth, D., Bourne, N.A., **Rombenso, A.N.**, **Simon, C.J.**, Wu, X., & Wade, N.M. (2022). Dietary fatty acid composition affects the apparent digestibility of algal carotenoids in diets for Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture Research*. Doi: 10.1111/are.15753.
- Emerenciano, M.G.C., **Rombenso, A.N.**, Vieira, F.d.N., Martins, M.A., Coman, G.J., **Truong, H.H.**, Noble, T.H., & **Simon, C.J.** (2022). Intensification of Penaeid shrimp culture: an Applied review of advances in production systems, nutrition and breeding. *Animals*, 12(3), 236.
- Noble, R.H., Rao, M., Briggs, M., Shinn, A.P., **Simon, C.**, & Wynne, J.W. (2021). Novacq™ improves survival of *Penaeus vannamei* when challenged with pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquaculture*, 545, 737235.
- Noble, T.H., **Truong, H.H.**, **Rombenso, A.**, **Simon, C.J.**, Wade, N.W., & Wynne, J.W. (2021). Effect of sample type and the use of high or low fishmeal diets on bacterial communities in the gastrointestinal tract of *Penaeus monodon*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 1301-1313.
- Rombenso, A.**, Irvin, S., **Truong, H.**, Musson, D., Perrin, T., Blyth, D., Emerenciano, M., Briggs, M., & **Simon, C.** (2020). Commercial microbial biomass additive evaluated in black tiger shrimp diets. *Global advocate aquaculture magazine*, 13 July 2020.
- Emerenciano, M.G.C., Fitzsimmons, K., **Rombenso, A.N.**, Miranda-Baeza, A., Martins, G.B., Lazzari, R., Fimbres-Acedo, Y.E., & Pinho, S.M. (2021). Biofloc Technology (BFT) in tilapia culture. *In book: Biology and Aquaculture of Tilapia*. CRC Press/Taylor & Francis Group 258-293.
- Freccia, A., Tubin, J.S.B., **Rombenso, A.N.**, & Emerenciano, M.G.C. (2020). Insects in Aquaculture Nutrition: an emerging eco-friendly approach or commercial reality? *InTech Open* Doi: 10.5772/intechopen.90489.
- Rombenso, A.N.**, **Truong, H.**, & **Simon, C.** (2019). Insights on hatchery feed for *Penaeus monodon* postlarvae: custard diets supplemented with microbial biomass Novacq™ improve survival and enhance growth of larger animals. *Hatchery Feeds*, 7(3), 27-30.

- Rombenso, A.N., Truong, H., & Simon, C.** (2020). Dietary butyrate alone or in combination with succinate and fumarate improved survival, feed intake, growth and nutrient retention efficiency of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 528, 735492.
- Rombenso, A.N., Esmaeili, M., Araujo, B., Emerenciano, M., Truong, H., Viana, M.T., Li, E., & Simon, C.** (2021). Macronutrient Research in Aquaculture Nutrition. *Global Aquaculture Advocate* 8 February 2021.
- Rombenso, A.N., Blyth, D., James, A.T., Nikalaou, T., & Simon, C.J.** (2021). Lipoxygenase enzymes, oligosaccharides (raffinose and stachyose) and 11sA4 and A5 globulins og glyvinin present in soybean meal are not drivers of enteritis in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Applied Sciences*, 11(19), 9327.
- Rombenso, A.N., Turchini, G.M., & Trushenski, J.T.** (2021). The omega-3 sparing effect of saturated fatty acids: a reason to reconsider common knowledge of fish oil replacement. *Reviews in aquaculture*, 14(1), 213-217.
- Rombenso, A.N., Duong, M.H., Hines, B.M., Ma, T., & Simon, C.J.** (2021). The marine microbial biomass, Novacq™, a useful feed additive for postlarvae and juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 530, 735959.
- Simon, C., Rombenso, A., Truong, H., Noble, T., Wynne, J., Porras, O., Wade, N., & Briggs, M.** (2019). Benefits of feeding microbial biomass on growth performance, feed efficiency, immunocompetence and gut microbiome of prawns. *AquaExpo 2019 Guayaquil*. Book of abstracts.
- Simon, C.J., Truong, H.H., Noble, T.H., Osborne, S.A., Wynne, J.W., & Wade, N.M.** (2020). Microbial biomass, marine invertebrate meals and feed restriction influence the biological and gut microbiota response of shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 520, 734679.
- Simon, C.J., Truong, H., Habilay, N., & Hines, B.** (2021). Feeding behaviour and bioavailability of essential amino acids in shrimp *Penaeus monodon* fed fresh and leached fishmeal and fishmeal-free diets. *Animals*, 11(3), 847.
- Simon, C.J., Bourne, N., Hines, B.M., Pirozzi, I., & Booth, M.** (2022). Estimation of apparent dietary nutrient digestibility in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* by near-infrared spectroscopy (NIRS). *Aquaculture*, 548, part 1, 737624.
- Truong, H.H., Moss, A.F., Bourne, N.A., & Simon, C.J.** (2020). Determining the importance of macro and trace dietary minerals on growth and nutrient retention in juvenile *Penaeus monodon*. *Animals*, 10(11), 2086.
- Truong, H., Hines, B.H., Rombenso, A.N., & Simon, C.J.** (2021). Feed intake, gastro-intestinal transit and haemolymph free amino acids in the shrimp *Penaeus monodon* are influenced by marine meal supplementation. *Aquaculture*, 533, 736171.
- Truong, H., Blyth, D., Habilay, N., Bourne, N., Wade, N., Hines, B., Rombenso, A., & Simon, C.** (2022). Faecal collection methods result in different estimates of nutrient apparent digestibility in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 551, 737957.

Wade, N.M., Trenkner, L.H., Viegas, I., Tavares, L.C., Palma, M., Skiba-Cassy, S., Dias, K., Vachot, C., Araujo, B.C., Bourne, N., Blyth, D., Irvin, S., & Glencross, B.D. (2020). Dietary starch promotes hepatic lipogenesis in barramundi (*Lates calcarifer*). *British Journal of Nutrition*, 124, 363-373.

Efecto de Manano-Oligosacáridos en el Crecimiento, Actividad de Enzimas Digestivas t Expresión de Genes Relacionados a la Mucosa Intestinal de Larvas de Pejelagarto *Atractosteus tropicus*

Claudia Ivette Maytorena Verdugo^{1,3*}, Emyr Saul Peña Marín^{1,2}, Álvarez-Villagómez, Carina Shianya, Pérez-Jiménez, Graciela María¹, Sepúlveda-Quiroz, César Antonio¹, Susana del Carmen de la Rosa-García¹, Rafael Martínez-García¹, Carlos Alfonso Álvarez González¹

¹Laboratorio de Fisiología en Recursos Acuáticos-DACBIOL, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa Cárdenas Km 0.5, 86139 Villahermosa, Tabasco, México.

²Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Av. Insurgentes Sur 1582, Col. Crédito Constructor, Del. Benito Juárez C.P., 03940, Ciudad de México.

³División Académica Multidisciplinaria de Jalpa de Méndez, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera estatal libre Villahermosa-Comalcalco Km 27 S/N, Ranchería, 86205 Jalpa de Méndez, Tabasco. *Correspondencia: clau.maytorena@gmail.com

Resumen

Los manano-oligosacáridos (MOS) son carbohidratos ramificados de cadena corta no digeribles compuestos por hasta 10 unidades de manosa unidas por enlaces α -(1,3) y α -(1,6), obtenidos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y su uso en acuicultura está bien documentado. El objetivo fue probar si MOS suplementado en la dieta de larvas de pejelagarto influye en los parámetros de crecimiento, la actividad de las enzimas digestivas y la expresión de genes relacionados con la barrera intestinal, para fortalecer a los animales en esta etapa crítica. La ganancia de peso de las larvas disminuyó con 2 y 4 g Kg⁻¹ de MOS. No se registraron diferencias de peso entre las larvas Control y las larvas alimentadas con 6 g Kg⁻¹ MOS. La longitud total más alta se registró en las larvas alimentadas con 6 g Kg⁻¹ MOS en comparación con las larvas control. Las larvas alimentadas con 2 y 4 g Kg⁻¹ de MOS también aumentaron su longitud. No hubo diferencias significativas en la ganancia de peso absoluta y el factor de condición K que estuvieran relacionadas con la inclusión de MOS en las dietas. En la tasa de crecimiento específica se observó un incremento con el tratamiento con 6 g Kg⁻¹ MOS. En cuanto la supervivencia, con los tratamientos 2 y 4 Kg⁻¹ MOS, las larvas tuvieron una menor supervivencia. La Figura 2 muestra el efecto de MOS sobre la actividad de las enzimas digestivas. La actividad de tripsina (Fig. 2C) aumentó con la adición de MOS a las dietas en comparación con el control, pero la actividad de leucina aminopeptidasa solo aumentó con 6 g Kg⁻¹ de MOS. La actividad de lipasa aumentó en las larvas alimentadas

con 2 y 4 g Kg⁻¹ de MOS. La actividad de α -amilasa fue mayor en las larvas alimentadas con 2 g Kg⁻¹ de MOS y 4 g Kg⁻¹ de MOS que en las larvas alimentadas con el control y 6 g Kg⁻¹ MOS. La expresión de *zo-2* fue mayor con el tratamiento 6 g Kg⁻¹ de MOS. La abundancia de transcritos de *cl-3* fue menor con 2 g Kg⁻¹ de MOS, pero mayor con 6 g Kg⁻¹ de MOS, y para *muc-2*, todas las concentraciones de MOS aumentaron la abundancia de transcritos, con resultados más altos usando 4 g Kg⁻¹ de MOS. En este estudio, la incorporación de manano-oligosacáridos en el alimento para larvas de pejelagarto, tiene un efecto positivo, siendo la concentración de 6 g Kg⁻¹ en donde se observaron los mejores resultados, por lo que incluir este prebiótico en las dietas para larvas es una buena opción para el cultivo de esta especie.

Keywords: *prebióticos; sistema digestivo; pejelagarto*

Introducción

Mejorar la nutrición de los peces a través de la dieta es un problema que la acuicultura quiere resolver. La investigación en nutrición de peces implica el estudio de los materiales necesarios para mantener la vida, la formación y reparación de los tejidos corporales y la producción de energía traducida al consumo de alimento y los mecanismos fisiológicos involucrados en su regulación, requerimientos e interacciones de nutrientes, vías metabólicas y utilización de nutrientes, crecimiento de los peces, reproducción y desarrollo temprano (Jobling, 2016); sin embargo, la atención se ha centrado en los animales sin considerar la microbiota. La microbiota juega un papel importante en el sustento vital de cualquier ser vivo, por lo que, a la hora de diseñar una dieta para cualquier especie, es importante tener en cuenta su papel.

El intestino representa la interfaz natural entre la microflora intestinal y el huésped; de hecho, las superficies mucosas del tracto gastrointestinal son los sitios principales donde los microorganismos ambientales y los antígenos interactúan con el huésped, a través de intensas interacciones cruzadas (Montalto *et al.*, 2009). El microbioma es la comunidad microbiana que ocupa un hábitat razonablemente bien definido que tiene propiedades químicas distintas y describe el genoma de todos los microorganismos (simbióticos y patógenos) que viven en los vertebrados; el microbioma intestinal comprende el genoma colectivo de microbios que habitan en el intestino, incluidas bacterias, arqueas, virus y hongos (Berg *et al.*, 2020).

La colonización microbiana, el establecimiento, la composición y la diversidad en el tracto gastrointestinal de los peces es un proceso complejo y se cree que refleja la composición microbiana de la cría, la dieta y su entorno (Nayak, 2010). Los microorganismos en el intestino utilizan moléculas grandes no digeribles para el huésped, y la descomposición metabólica por parte de los microorganismos en el intestino actúa sobre el perfil y funcionalidad de la microbiota intestinal, otorgándole una acción positiva sobre el huésped para mejorar la eficiencia alimentaria y el crecimiento (Gainza y Romero, 2020). Ejemplos de estas moléculas no digeribles son los prebióticos, que son sustratos que los microorganismos del huésped utilizan de forma selectiva y confieren un beneficio para la salud (Gibson *et al.*, 2017).

Los manano-oligosacáridos (MOS) son carbohidratos ramificados de cadena corta no digeribles compuestos por hasta 10 unidades de manosa unidas por enlaces α -(1,3) y α -(1,6), obtenidos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y su uso en acuicultura está bien documentado (Ringø *et al.*, 2010). El uso de MOS para bloquear la colonización de patógenos se deriva de la concepción de que ciertos polisacáridos podrían usarse para bloquear el mecanismo de reconocimiento y adhesión de patógenos potenciales a moléculas en las superficies de los tejidos del huésped (competencia por los sitios de unión). Esta acción reduciría la adhesión de los patógenos al tracto digestivo, dejándolos excretados en las heces. Esto puede conducir a la mejora de la integridad y el rendimiento de la barrera epitelial intestinal (Gainza y Romero 2020).

El microbioma intestinal de *A. tropicus* comprende *Fusobacteria* (42,26%), *Proteobacteria* (31,40%), *Firmicutes* (12,96%) y *Bacteroidetes* (11,79%) con nueve cepas con potencial probiótico, *Lactococcus lactis* CAU929, CAU6600, CAU9951 y Cp6; *Cetobacterium* H69, *Aeromonas hydrophila* P5 y WR-5-3-2, *Aeromonas sobria* CP DC28, *Aeromonas hydrophila* (Méndez-Pérez *et al.*, 2020). La presencia de esas cepas con potencial probiótico ayuda a explicar los resultados en juveniles de *A. tropicus* alimentados con MOS al 0.2%, donde la adición de MOS aumentó la ganancia de peso, la tasa de crecimiento específico y la tasa de eficiencia proteica (Nájera-Arzola *et al.*, 2018). Sin embargo, no está claro si estas cepas probióticas podrían ayudar al pejelagarto en una etapa larval, o si la microbiota en etapa larval posea cepas que pueden hidrolizar manano-oligosacáridos, mejorando su crecimiento. y desempeño en esta etapa crítica, por lo que, en este trabajo, para dar un acercamiento a contestar estas preguntas, el objetivo fue probar si MOS suplementado en la dieta de larvas de pejelagarto influye en los parámetros de crecimiento, la actividad de las enzimas digestivas y la expresión de genes relacionados con la barrera intestinal, para fortalecer a los animales en esta etapa crítica.

Materiales y métodos

Dietas experimentales

En este experimento se utilizó una dieta base (Frías-Quintana *et al.*, 2016) y se adicionaron 2, 4 y 6 g Kg⁻¹ de MOS a los tratamientos. Las dietas experimentales (Tabla 1) se mantuvieron

a -20 °C hasta su uso. Antes de iniciar el bioensayo, las dietas fueron molidas y tamizadas para obtener tamaños de partícula específicos (20-150 µm) de acuerdo con el crecimiento larvario.

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales.

Ingredientes (g Kg ⁻¹) / MOS (g Kg ⁻¹)	0	2	4	6
Harina de pescado ^a	300	300	300	300
Harina de pollo ^a	150	150	150	150
Harina de cerdo ^a	150	150	150	150
Harina de soya ^a	150	150	150	150
Almidón ^b	174.5	172.5	170.5	168.5
Aceite de soya ^c	69	69	69	69
MOS ^d	0	2	4	6
Mezcla de minerales ^e	0.5	0.5	0.5	0.5
Mezcla de vitaminas ^e	1	1	1	1
Gelatina ^f	2	2	2	2
Vitamina C ^g	2	2	2	2
Vitamina E ^g	1	1	1	1

^a Proteínas Marinas y Agrícolas S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco; ^b Pronat Ultra, Yucatán, México; ^c Industrias Ragasa S.A. de C.V.; ^d Agaviótica, Monterrey, Nuevo León; ^e Composición de la mezcla de vitaminas y minerales: vitamina A, 10,000,000 UI; vitamina D3, 2,000,000 UI; vitamina E, 100,000 UI; vitamina K3, 4.0 g; tiamina B1, 8.0 g; Riboflavina B2, 8.7 g; Piridoxina B6, 7.3 g; vitamina B12, 20.0 mg; niacina, 50.0 g; ácido pantoténico, 22.2 g; Inositol, 0.15 mg; ácido nicotínico, 0.16 mg; ácido fólico, 4.0 g; biotina, 500 mg; vitamina C, 10.0 g; Colina 0.3 mg, Excipiente c.s.p. 2 g; manganeso, 10 g; magnesio, 4.5 g; zinc, 1.6 g; hierro, 0.2 g; cobre, 0.2 g; yodo, 0.5 g; selenio, 40 mg; Cobalto 60 mg; ^f D'gari, Productos alimenticios Relámpago, S.A. de C.V.; ^g Rovimix Stay-C 35 DSM, Jalisco.

Bioensayo

Las larvas de *A. tropicus* se obtuvieron de un stock de reproductores de desove inducido (1 hembra y 3 machos) de un lote reproductor en el Laboratorio de Acuicultura Tropical DACBIOL-UJAT, México. El desove se indujo inyectando LHRHa (30 µg Kg⁻¹ de peso) a la hembra en un tanque circular de 2000 L. Cuatro días después de la eclosión (dah), las larvas de *A. tropicus* se distribuyeron aleatoriamente en doce tanques experimentales de 70 L con un sistema de recirculación operado por una bomba de agua de 0.5 HP y un filtro biológico. La calidad del agua se monitoreó diariamente utilizando un oxímetro YSI 85 (Ysi, Yellow Springs, OH) y un potenciómetro A HANNA HI 991001 (HANNA instruments, Woonsocket, RI) manteniendo una temperatura promedio de 27.1 ± 0.8 °C, oxígeno disuelto alrededor de 5.7 ± 0.2 mg L⁻¹ y pH cercano a 7.3 ± 0.2. Los tanques se inspeccionaron

diariamente en busca de mortalidad, y cualquier exceso de comida y heces se retiró de los tanques.

Los tratamientos se realizaron por triplicado utilizando 150 larvas por tanque y el experimento tuvo una duración de 20 días. Desde el día uno, las larvas fueron alimentadas con polvo de la dieta correspondiente y nauplios de *Artemia* cuatro veces al día (7:00, 11:00, 15:00 y 19:00 h). Seis días después de la eclosión, las larvas fueron alimentadas con una mezcla de sus correspondientes dietas experimentales y biomasa de *Artemia*, y a partir del día 12, solo con las dietas experimentales hasta el final del experimento. Al final del ensayo, se tomaron muestras de nueve larvas por tratamiento (tres por réplica) para cuantificar la actividad de enzimas digestivas, también se recolectaron nueve larvas por tratamiento (tres larvas por réplica) y se mantuvieron en una solución para conservar el ARN (RNAlater) y así poder hacer el análisis de expresión génica. Todas las larvas recolectadas se lavaron con agua destilada y se cortaron cabezas y colas. Todas las muestras fueron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Evaluación de los parámetros de crecimiento

Al inicio, día 12 y final del experimento (día 20), se tomaron muestras de larvas de cada tratamiento y réplica experimental para determinar el peso húmedo (g), utilizando una balanza analítica (Ohaus HH120, Shenzhen, China), y la longitud total (cm) a través de fotografía a escala, calculada con el Software Image 1.5. Al final de la prueba, se calcularon los siguientes parámetros, ganancia de peso absoluta (AWG): peso final (g) - peso inicial (g); tasa de crecimiento específica (SGR): $[(\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{días}] \times 100$; factor de condición (K): $(\text{peso corporal medio final} / \text{longitud corporal media final}) \times 100$; y supervivencia (S): $(\text{número de peces finales} / \text{número de peces iniciales}) \times 100$.

Cuantificación de enzimas digestivas

Se homogenizaron tres muestras de larvas por cada réplica experimental en agua destilada con pistilos en una proporción 1 a 10. Después los homogenados se centrifugaron a 10,000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. El sobrenadante se conservó en alícuotas y se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. La proteína soluble se cuantificó con el método de Bradford (1976).

Proteasas ácidas y alcalinas

La actividad de proteasas ácidas totales de los extractos se cuantificó usando hemoglobina al 0.5% como sustrato en amortiguador de glicina-HCl 100 mM a pH 2.0, la reacción se detuvo con ácido tricloroacético (ATC) al 10% y se midió la absorbancia de la tirosina liberada a 280 nm (Anson 1938). La actividad de proteasas alcalinas totales se determinó con la técnica descrita por Walter (1984), utilizando caseína al 1% en amortiguador Tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM a pH 9.0. La reacción se detuvo con ATC al 10% y se midió la absorbancia de la tirosina liberada a 280 nm.

Quimotripsina

La actividad de quimotripsina se cuantificó usando SAApNA como sustrato (Cat. No. S7388, Sigma-Aldrich). Se preparó una solución madre de 50 mM del sustrato con DMSO, después la solución de trabajo se preparó a una concentración de 1.25 mM con Tris-HCl 50 mM, pH 8.0. Se mezclaron quince microlitros de extracto del sistema digestivo con 135 µl del sustrato con amortiguador para medir la absorbancia de la nitroanilida liberada a 410 nm en una cinética de 30 min (García-Carreño *et al.*, 1994).

Tripsina

La actividad de tripsina se cuantificó utilizando BAPNA como sustrato (Cat. No. B4875, Sigma-Aldrich). Se preparó una solución madre de 122.78 mM del sustrato con DMSO y la solución de trabajo se preparó diluyendo la solución madre a una concentración de 2 mM con Tris-HCl 50 mM, pH 8.0. Se mezclaron quince microlitros del extracto del sistema digestivo con 135 µl del sustrato para medir la absorbancia de la nitroanilida liberada a 410 nm en una cinética de 15 min (García-Carreño *et al.*, 1994).

Leucina-aminopeptidasa

La actividad de leucina aminopeptidasa se cuantificó usando L-leucina-*p*-nitroanilida como sustrato (Cat. No. L9125, Sigma-Aldrich). Se preparó una solución madre de 250 mM del sustrato con DMSO y la solución de trabajo se preparó a una concentración de 4 mM diluida con fosfato de sodio 50 mM, pH 7.2. Se mezclaron quince microlitros del extracto del sistema digestivo con 135 µl de la mezcla de sustrato y amortiguador para medir la

absorbancia de la nitroanilida liberada a 410 nm en una cinética de 30 minutos (Maraoux *et al.*, 1973).

Lipasa

La actividad de lipasa se determinó utilizando acetato de β -naftilo (100 mM) como sustrato disuelto en Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 con taurocolato de sodio (100 mM) a 37 °C deteniendo la reacción con ATC a 0.72 N. Posteriormente se añadió un colorante (Fast blue 100 mM) y una mezcla de etanol/acetato de etilo 1:1 y se midió la absorbancia a 540 nm usando un ϵ de 0.02 ml $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Versaw *et al.*, 1989).

α -Amilasa

La actividad de α -amilasa se cuantificó utilizando como sustrato almidón al 2% y citrato de sodio (100 mM), NaCl 50 mM, pH 7.5. Se incubaron 5 μl de la muestra a 37 °C durante 60 min y la actividad se cuantificó a 600 nm con un ϵ de 3,400 ml $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Todos los datos obtenidos se muestran como U mg^{-1} (Robyt & Whelan, 1968).

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El ARN total de cada muestra de larvas se aisló usando Trizol (Invitrogen, Waltham, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza de las muestras de ARN se evaluaron mediante la relación de absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Jenway GenovaNano, Cole-Parmer, Staffordshire, Reino Unido). Un microgramo de ARN se transcribió inversamente en ADNc en un termociclador (Mastercycle nexus GSX1, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, ThermoScientific, Waltham, MA) en un volumen final de 20 μl , siguiendo las recomendaciones del fabricante. El programa de PCR estándar utilizado fue: 5 min a 65 °C, 10 min a 25 °C, 50 min a 42 °C (extensión de cadena de ADNc), 15 min a 70 °C (inactivación de transcriptasa inversa) y finalmente 20 min a 37 °C.

Análisis de expresión génica

La expresión génica de marcadores de la función de barrera intestinal se seleccionó con base en el trabajo de Pérez-Jiménez (en proceso), siendo *zo-1*, *zo-2*, *cl-3*, *cl-15*, y *muc-2* los genes seleccionados. Las reacciones de qPCR se realizaron en un termociclador en tiempo real CFX96™ (BioRad, Hercules, CA) usando 10 µl de la mezcla Sso EvaGreen (BioRad, Hercules, CA), 9 µl de ADNc (5 ng µl⁻¹) y 0.15 µM de cada cebador, en un volumen final de 20 µl en las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización de 10 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C.

Se realizó un control negativo con cada ejecución reemplazando la plantilla de ADNc con agua estéril en la mezcla de qPCR. Todas las reacciones se realizaron por duplicado. El gen de β-actina se utilizó como referencia para la normalización. La expresión génica relativa se calculó mediante la fórmula ΔΔCt (Livak & Schmittgen, 2001).

Análisis estadístico

Para todos los análisis se realizó ANOVA de una vía y en caso de encontrar diferencias se utilizó la prueba de Tukey utilizando el software GraphPad Prism 9 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) con un valor de significancia de 0.05.

Resultados

Parámetros de crecimiento influenciados por la suplementación con MOS

La ganancia de peso de las larvas disminuyó con 2 y 4 g Kg⁻¹ de MOS (0.0745 ± 0.065 g y 0.0653 ± 0.001 g). No se registraron diferencias de peso entre las larvas Control y las larvas alimentadas con 6 g Kg⁻¹ MOS (0.080 ± 0.001 g y 0.082 ± 0.003 g) ($p > 0.05$) (Fig. 1A). La longitud total más alta se registró en las larvas alimentadas con 6 g Kg⁻¹ MOS (2.775 ± 0.031 cm) en comparación con las larvas control (2.588 ± 0.043 cm). Las larvas alimentadas con 2 y 4 g Kg⁻¹ de MOS también aumentaron su longitud (2.646 ± 0.026 cm y 2.67 ± 0.05 cm) (Fig. 1B).

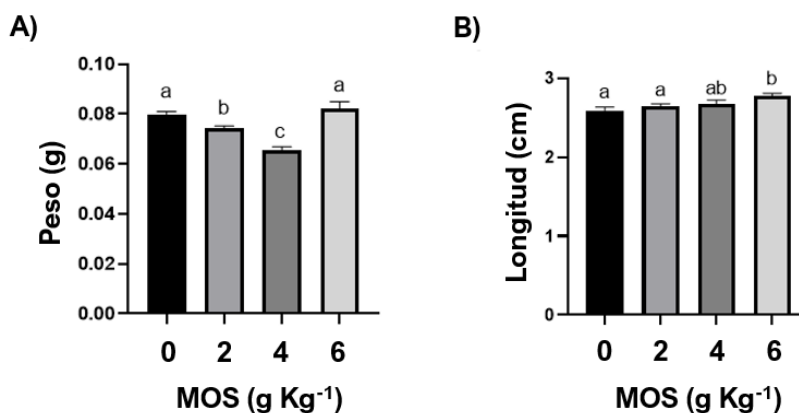


Figura 1. Efecto de mannano-ligosacáridos en el crecimiento de larvas de pejelagarto. Las letras sobre las barras indican diferencias entre los grupos ($p > 0.05$).

En la Tabla 2 se presentan los resultados de parámetros de crecimiento. No hubo diferencias significativas en la ganancia de peso absoluta y el factor de condición K que estuvieran relacionadas con la inclusión de MOS en las dietas. En la tasa de crecimiento específica se observó un incremento con el tratamiento con 6 g Kg⁻¹ MOS ($p = 0.0226$). En cuanto la supervivencia, con los tratamientos 2 y 4 Kg⁻¹ MOS, las larvas tuvieron una menor supervivencia ($p = 0.0005$ y $p = 0.0001$, respectivamente).

Tabla 2. Parámetros de crecimiento e índices de utilización del alimento en larvas alimentadas con MOS.

Parámetro / MOS (g Kg ⁻¹)	0	2	4	6
AWG (g pez ⁻¹)	0.042 ± 0.009	0.056 ± 0.009	0.055 ± 0.009	0.067 ± 0.016
SGR (% d ⁻¹)	5.31 ± 0.81 ^a	7.23 ± 0.71 ^a	7.35 ± 0.72 ^a	7.79 ± 1.13 ^b
K	0.439 ± 0.051	0.484 ± 0.050	0.430 ± 0.044	0.446 ± 0.076
S (%)	24.87 ± 1.26 ^a	15.14 ± 2.57 ^b	13.16 ± 0.72 ^b	25.28 ± 1.67 ^a

Efecto de MOS sobre la actividad de las enzimas digestivas

La Figura 2 muestra el efecto de MOS sobre la actividad de las enzimas digestivas. La actividad de proteasas alcalinas y ácidas no cambió con la suplementación con MOS al comparar los grupos con el control (Fig. 2A y 2B), lo mismo se observó con la actividad de quimotripsina (Fig. 2D). La actividad de tripsina (Fig. 2C) aumentó con la adición de MOS a las dietas (2 g Kg⁻¹ MOS, $p = 0.0072$; 4 g Kg⁻¹ MOS, $p = 0.0213$; 6 g Kg⁻¹ MOS, $p = 0.0048$) en comparación con el control, pero la actividad de leucina aminopeptidasa solo aumentó

con 6 g Kg⁻¹ de MOS ($p = 0.0074$; Fig. 2E). La actividad de lipasa aumentó en las larvas alimentadas con 2 y 4 g Kg⁻¹ de MOS ($p = 0.0021$ y $p = 0.0085$), la actividad de lipasa en el grupo de 6 g Kg⁻¹ de MOS fue igual a la del grupo control (Fig. 2F). La actividad de α -amilasa fue mayor en las larvas alimentadas con 2 g Kg⁻¹ de MOS y 4 g Kg⁻¹ de MOS que en las larvas alimentadas con el control y 6 g Kg⁻¹ MOS ($p = 0.0387$ y $p = 0.0146$; Fig. 2G).

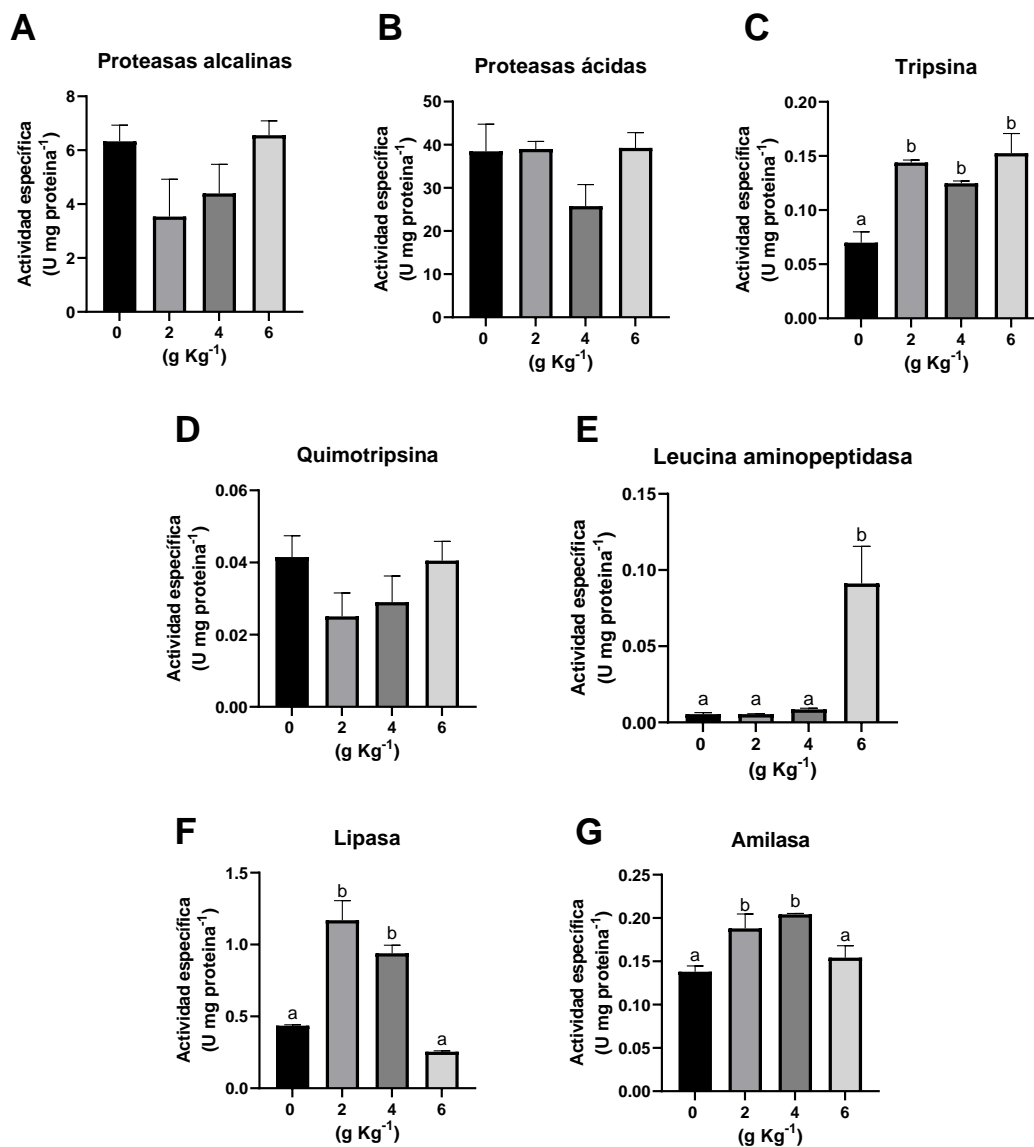


Figura 2. Efecto de mannano-ligosacáridos en la actividad de enzimas digestivas. Las letras sobre las barras indican diferencias entre los grupos ($p > 0.05$).

Efecto de MOS sobre la expresión génica de las proteínas de la barrera intestinal

La Figura 3 muestra la expresión relativa de *zo-1*, *zo-2*, *cl-3*, *cl-5* y *muc-2* bajo el efecto de MOS suplementado en la dietas para larvas de pejelagarto. La abundancia de transcritos de *zo-1* y *cl-15* no se vió afectada por la inclusión de MOS (Fig. 3A y 3D). Para los otros genes, la expresión de *zo-2* fue mayor con el tratamiento 6 g Kg⁻¹ de MOS ($p = 0.0334$), las concentraciones más bajas de MOS no tuvieron ningún efecto. La abundancia de transcritos de *cl-3* fue menor con 2 g Kg⁻¹ de MOS ($p = 0.0349$) pero mayor con 6 g Kg⁻¹ de MOS ($p = 0.0009$), y para *muc-2*, todas las concentraciones de MOS aumentaron la abundancia de transcritos, con resultados más altos usando 4 g Kg⁻¹ de MOS ($p = 0.0001$).

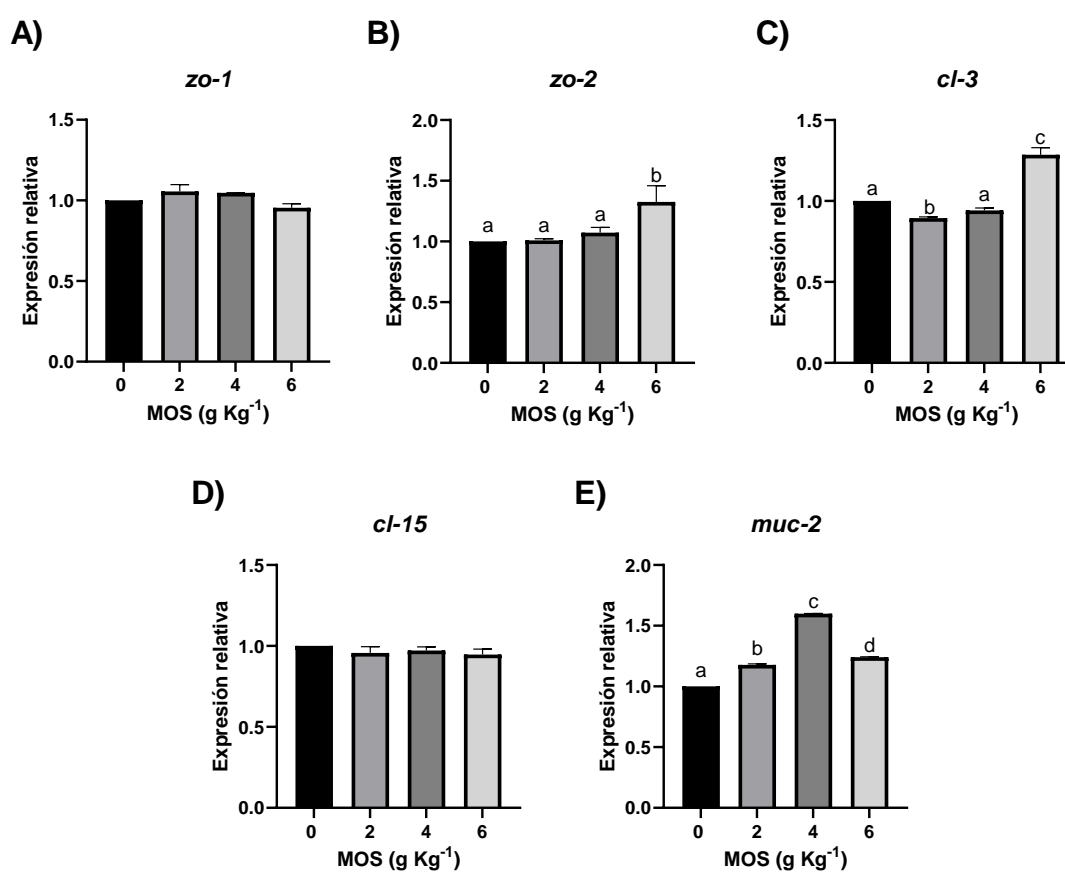


Figura 3. Efecto de mannano-ligosacáridos en la expresión relativa de los genes participantes en la barrera intestinal. Las letras sobre las barras indican diferencias entre los grupos ($p > 0.05$).

Discusión

Los prebióticos son ingredientes funcionales no digeribles que estimulan el crecimiento y/o metabolismo de bacterias en el tracto intestinal (Gatlin III & Peredo 2012). Para que un ingrediente se considere como prebiótico debe cumplir las siguientes características: (a) ser resistente a la acidez gástrica y no ser hidrolizado por las enzimas gastrointestinales, (b) no ser absorbidos por el tracto intestinal, (c) estimular selectivamente un número limitado de cepas benéficas, y (d) mejorar la inmunidad local o sistémica frente a la invasión de patógenos (Roberfroid 2007; Teng & Kim 2018). Algunos ejemplos de prebióticos usados en la acuicultura son los β -glucanos, manano-oligosacáridos y los fructooligosacáridos. Los β -glucanos son polisacáridos compuestos de unidades de glucosa unidas por enlaces β -(1,3)-glucosídicos. Dependiendo de la fuente de β -glucanos, se pueden encontrar diferencias estructurales entre éstos, siendo los de alto peso molecular los que activan leucocitos, estimulando su actividad fagocítica, citotóxica y antimicrobiana. Los β -glucanos de bajo peso molecular tienen menor efecto sobre las células y glucanos de cadena corta se consideran inactivos (Meena *et al.*, 2013). Los manano oligosacáridos son carbohidratos complejos que componen la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en donde monómeros de manosa se unen por enlaces glucosídicos y tienen la función de activar los receptores y proteínas de reconocimiento del sistema inmune innato en respuesta a sustancias desconocidas (Torrecillas *et al.*, 2014), mientras que los fructooligosacáridos están compuestos por monómeros de fructosa unidos por enlaces β -(2-1) glucosídicos formando cadenas cortas y medianas para terminar con un monómero de glucosa (Ringø *et al.*, 2010).

El uso de estos prebióticos en la acuicultura ha traído resultados con variaciones dependiendo del tipo de prebiótico y concentración, y el modelo de estudio, por ejemplo, la inclusión de fructooligosacáridos en una concentración de 10 g Kg⁻¹ en el alimento del salmón del Atlántico no tuvo efecto en el crecimiento ni digestibilidad, sin embargo, concentraciones de 2 y 6 g Kg⁻¹, aumentaron la sobrevivencia e inmunidad no específica de tilapias (Ringø *et al.*, 2010). En salmón del atlántico (*Salmo salar*), una inclusión de MOS aumentó los parámetros de crecimiento y mejoró la eficiencia alimenticia en comparación con FOS y GOS, y el alimento control (Gridale-Helland *et al.*, 2008). En larvas de cobia (*Rachycentron canadum*), la inclusión de MOS favoreció la supervivencia y en el aumento

de las microvellosidades intestinales en concentraciones de 55 y 65 g Kg⁻¹ de MOS (Salze *et al.*, 2008). En juveniles de *Channa striata*, una inclusión de 2 g Kg⁻¹ de MOS aumentó la ganancia de peso absoluta (Talpur *et al.*, 2014), sin embargo, en las larvas de pejelagarto, la ganancia de peso absoluta y supervivencia disminuyó a concentraciones de 2 y 4 g Kg⁻¹ de MOS, pero usando 6 g Kg⁻¹ de MOS, la supervivencia aumentó fue igual al del grupo control. Es difícil relacionar todas las variantes que pueden afectar a la supervivencia de un cultivo larval, sin embargo, en muchos trabajos se ha coincidido en que la alimentación es un factor importante. Pérez-Jiménez (2020) encontró que la inclusión de FOS en las dietas para larvas de pejelagarto también aumentaban la supervivencia y la tasa de crecimiento específica a una concentración de 7.5 g Kg⁻¹.

La actividad de enzimas digestivas y sus cambios con respecto a la inclusión de prebióticos en la dieta tiene resultados diferentes si consideramos a la especie. En la carpa común (*Cyprinus carpio*), la actividad de proteasas totales, tripsina, lipasa y α -amilasa aumentó con una combinación de MOS y β -glucanos (Mohammadian *et al.*, 2019). En el fletán japonés (*Paralichthys olivaceus*), la actividad de amilasa y proteasas aumentó con 2.5 y 5 g Kg⁻¹ de MOS, respectivamente (Ye *et al.*, 2011). En larvas de pejelagarto, solamente la actividad de tripsina, leucina aminopeptidasa, lipasa y amilasa aumentó con la inclusión de MOS. Nájera-Arzola y colaboradores (2018) también encontraron un aumento en la actividad de enzimas digestivas con juveniles alimentados con 4 g Kg⁻¹ MOS. En este trabajo, la actividad de tripsina, lipasas y amilasas coincide con lo encontrado en juveniles, pero no con la actividad de leucina aminopeptidasa. Sepúlveda-Quiroz *et al.*, (2020) encontró que la inclusión de 5 g Kg⁻¹ FOS en las dietas de juveniles de pejelagarto aumentaba la actividad proteasas ácidas, quimotripsina y leucina aminopeptidasa, esto sugiere que los diferentes prebióticos más usados en la acuicultura, tienen efectos diferentes sobre una misma especie.

Algunos de los efectos beneficiosos de los manano-oligosacáridos en la dieta sobre el rendimiento de los peces, y el consumo y la utilización del alimento se han relacionado con una mejora en la integridad funcional de la membrana del enterocito, en relación con una mayor asimilación o digestión de nutrientes específicos o con posibles cambios en los niveles de péptidos que regulan el sistema de saciedad (señales de saciedad y apetito) como NYY,

CCK y ghrelina, y el sistema a largo plazo (reservas de energía corporal), proporcionando información para el sistema de alimentación central hipotalámico que controla la ingesta de alimento y en consecuencia la liberación de enzimas digestivas. Sin embargo, parece que la forma del MOS suplementado, la dosis y la duración de la suplementación en relación con la especie y el tamaño de los peces, así como las condiciones adecuadas de crianza son factores determinantes para lograr mejoras en el crecimiento y la conversión alimenticia (Torrecillas *et al.*, 2014). Es por lo anterior que en este trabajo también se midió la expresión de genes que son parte de la barrera intestinal. En muy pocos trabajos se han considerado a las proteínas que forman parte de la barrera intestinal como parámetros para evaluar el efecto de prebióticos en alguna especie. Sepúlveda-Quiroz *et al.*, (2020) reportaron que juveniles de *A. tropicus* alimentados con 10 y 15 g Kg⁻¹ de FOS aumentaban la expresión de *muc-2*. Mientras que, Nieves-Rodríguez *et al.*, (2018) no encontraron diferencias en la expresión de *muc-2* con la suplementación de β -glucanos en juveniles de *A. tropicus*. En este trabajo, las larvas de pejelagarto que fueron alimentadas con 4 g Kg⁻¹ tuvieron una mayor expresión de este gen, el cual codifica a la proteína mucina-2 la cual es el mayor componente del moco intestinal, y ayuda a proteger contra enfermedades inflamatorias (Heazlewood *et al.*, 2008). El papel principal de las claudinas es la regulación de la selectividad paracelular a iones pequeños. Las claudinas son equivalentes a poros selectivos de carga que promueven la permeabilidad de iones específicos, aunque también hay ejemplos de claudinas que generalmente aumentan en lugar de restringir la permeabilidad paracelular (Findley & Kovac, 2010). En este trabajo, las larvas de pejelagarto disminuyeron la expresión de *cl-3* con 2 g Kg⁻¹ MOS y la aumentaron con 6 g Kg⁻¹ MOS. Pérez-Jiménez (2020) también encontró que la expresión de *cl-3* aumentaba con la presencia de 7.5 g Kg⁻¹ FOS usando como modelo, larvas de pejelagarto. ZO-2 es una proteína de unión estrecha periférica que pertenece a la familia de proteínas de guanilato quinasa asociada a membrana la cual permite la interacción con una amplia variedad de moléculas, incluidas las proteínas de adhesión celular, los componentes del citoesqueleto y los factores nucleares (González-Mariscal *et al.*, 2017). En larvas de pejelagarto, la expresión de *zo-2* aumentó con el tratamiento 6 g Kg⁻¹ MOS. Pérez-Jiménez (2020) también encontró un aumento de este gen cuando larvas de pejelagarto se alimentaron con 7.5 g Kg⁻¹ FOS. En peces, los trabajos que consideran la expresión de proteínas de la barrera intestinal son casi nulos, y es en donde éste y otros

trabajos en donde se ha utilizado al pejelagarto como modelo dan pauta para explorar el efecto de otros prebióticos, incluso probióticos y simbióticos en estos genes.

Conclusión

En este estudio, la incorporación de manano-oligosacáridos en el alimento para larvas de pejelagarto, tiene un efecto positivo, siendo la concentración de 6 g Kg⁻¹ en donde se observaron los mejores resultados de crecimiento y actividad de enzimas digestivas. En cuanto a la expresión de genes de la barrera intestinal, los tratamientos con 4 y 6 g Kg⁻¹ MOS, también generaron resultados positivos al aumentar la expresión de *zo-2*, *cl-3*, y *muc-2*. Aun queda trabajo por hacer en esta línea de investigación, ya se encontró que MOS tiene un efecto positivo en las larvas, por lo que se infiere que la microbiota intestinal posee cepas que tienen la maquinaria enzimática para poder utilizar a estos carbohidratos como sustrato, por lo que se sugiere que en futuros trabajos se busque identificar a estas cepas de la microbiota intestinal.

Referencias

- Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology*, 22 (1): 79–89. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Champomier Vergès, M. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Herrero Corral, G., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Maunchline, T., McClure, R., Mitter, B., Ryan, M., Sarand, I., Smidt, H., Schelkle, B., Roume, H., Seghal Kiran, G., Selvin, J., Soares Correa de Souza, R., van Overbeek, L., Singh, B. K., Wagner, M., Walsh, A., Sessitsch, A., Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8, 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Findley, M. K., Koval, M. (2010) Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life*, 61, 431-437. <https://doi.org/10.1002/iub.175>
- Frías-Quintana, C. A., Domínguez-Lorenzo, J., Álvarez-González, C. A., Tovar-Ramírez, D., Martínez-García, R. (2016). Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 42, 517-528. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0156-4>
- Gainza, O. & Romero, J. (2020) Effect of mannan oligosaccharides on the microbiota and productivity parameters of *Litopenaeus vannamei* shrimp under intensive cultivation in Ecuador. *Scientific Reports*, 10: 2719. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59587-y>
- García-Carreño, F. L., Hernández-Cortés, M., & Haard, N. F. (1994). Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42, 1456–1461.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E. Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., Reid, G. (2017). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14, 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- González-Marisal, L., Miranda, J., Raya-Sandino, A., Domínguez-Calderón, A., Cuellar-Perez, F. (2017) ZO-2, a tight junction protein involved in gene expression, proliferation, apoptosis, and cell size regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1397, 35-53. <https://doi.org/10.1111/nyas.13334>
- Grisdale-Helland, B., Helland, S. J., Gatlin III, D. M. (2008) The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 283: 163-167. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.012>

- Heazlewood, C., Cook, M., Eri, R., Price G., Tauro, S., Taupin, D., Thornton, D., Png, C., Crockford, T., Cornall, R., Adams, R., Kato, M., Nelms, K., Hong, N., Florin, T., Goodnow, C. & McGuckin, M. (2008). Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Medicine*, 5(3), e54. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050054>
- Jobling, M. (2016). Fish nutrition research: past, present and future. *Aquaculture International*, 24: 767-786. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9875-2>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Maroux, S., Louvard, D., & Barath, J. (1973). The aminopeptidase from hog intestinal brush border. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)–Enzymology*, 321(1), 282–295. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(73\)90083-1](https://doi.org/10.1016/0005-2744(73)90083-1)
- Méndez-Pérez, R., García-López, R., Bautista-López, J. S., Vázquez-Castellanos, J., Álvarez- González, C., Peña-Marín, E., Baltierra-Trejo, E., Adams-Schroeder, R., Domínguez-Rodríguez, V., Melgar-Valdés, C., Martínez-García, R., Moya, A., Gómez-Cruz, R. (2020). High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene to analyze the gut microbiome in juvenile and adult tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 48(3). <https://doi.org/10.3856/vol48-issue3-fulltext-2419>
- Montalto, M., D'Onofrio F. D., Gallo, A., Cazzato, A., Gasbarrini, G. (2009) Intestinal microbiota and its functions. *Digestive and Liver Disease Supplements*, 3(2), 30-34. [https://doi.org/10.1016/S1594-5804\(09\)60016-4](https://doi.org/10.1016/S1594-5804(09)60016-4)
- Mohammadian, T., Nasirpour, M., Tabandeh, M. R., Mesbah, M. (2019) Synbiotic effects of β -glucan, mannan oligosaccharide and *Lactobacillus casei* on growth performance, intestine enzymes activities, immunehematological parameters and immune-related gene expression in common carp, *Cyprinus carpio*: An experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 511, 634197. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.06.011>
- Nájera-Arzola, I. C. Álvarez-González, C. A., Frías-Quintana, C. A., Peña, E., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., Méndez-Marín, O., Gisbert, E. (2018). Evaluation of Mannan oligosaccharides (MOS) in balanced diets for tropical gar juveniles (*Atractosteus tropicus*). *Hidrobiológica*, 28(3), 239-246.
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41(11), 1553-1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>
- Nieves-Rodríguez, K., Álvarez-González, C., Peña-Marín, E., Vega-Villasante, F., Martínez-García, R. & Camarillo-Coop, S. (2018). Effect of β -Glucans in diets on growth, survival, digestive enzyme activity, and immune system and intestinal barrier gene expression for Tropical Gar (*Atractosteus tropicus*) juveniles. *Fishes*, 3(3), 27. <https://doi.org/10.3390/fishes3030027>

- Pérez-Jiménez, G. M. (2020) Efecto del prebiótico fructooligosacárido (FOS) sobre la fisiología digestiva y barrera intestinal en larvas de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Tesis de Maestría. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T. Ø., Dalmo, R. A., Amlund, H., Hemre, G.-I., Bakke, A. M. (2010). Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition*, 16, 117-136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x>
- Roby, J. F., & Whelan, W. (1968). Amylases. In J. A. Radley (Ed.), *Starch and its derivatives*. London, UK: Chapman and Hall.
- Salze, G., McLean, E., Schwarz, M. H., Craig, S. R. (2008) Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval coho. *Aquaculture* 274, 148-152. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.008>
- Sepúlveda-Quiroz, C. A., Peña-Marín, E. S., Pérez-Morales, A., Martínez-García, R., Alvarez-Villagomez, C. S., Maytorena-Verdugo, C. I., Camarillo-Coop, S., Vissio, P. G, Pérez Sirkin, D., Tovar-Ramírez, D., Galaviz, M., Álvarez-González, C. A. (2020) Fructooligosaccharide supplementation in diets for tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juvenile: Effects on morphophysiology and intestinal barrier function. *Aquaculture Research*, 00, 1-14. <https://doi.org/10.1111/are.14867>
- Talpur, A. D., Munir M. B., Mary, A., Hashim, R. (2014) Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. *Aquaculture*, 426-427, 14-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.013>
- Torrecillas, S., Montero, D., Izquierdo, M. (2014) Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. *Fish & Shellfish Immunology* 36, 525-544. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.029>
- Versaw, W., Cuppett, S. L., Winters, D. D., & Williams, L. E. (1989). An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *Journal of Food Science*, 54(6), 232-254. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb05159.x>
- Walter, H. E. (1984). Proteinases: Methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H. U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis Vol. 5* (pp. 270-277). Verlag Chemie. Weinheim, Germany
- Ye, J.D., Wang, K., Li, F. D., Sun, Y. Z. (2011) Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition*, 17:e902e11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00863.x>

**Review of Bacterial and Yeast Base Single Cell Protein Ingredients as
Attractants and Fish Meal Replacements in Diets
for *Litopenaeus vannamei***

Addison L. Lawrence*, Mayra L. González-Félix, Martin Perez-Velazquez, Yuan Yuan,
Stephen A. Watts

*Texas A&M AgriLife Research, Texas A&M University System, 10345 Hwy 44, Corpus
Christi, Texas 78406, USA. E-mail: addisonlawrence1935@gmail.com

Fishmeal (FM) is extensively used as an ingredient in aquafeeds as an attractant and a major source of protein, resulting in an exploitation of natural fisheries to the level that they are not sustainable nor healthy. Global FM harvest has remained at 4.6 to 6 million metric tons/year for the last 10 years while world aquaculture production has increased from 52.5 million metric tons to 82.1 million metric tons from 2008 to 2018. Of this total amount, marine shrimp accounted for over five million metric tons in 2018. Over 80% of global commercial production of marine shrimp for human consumption use Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. This has stimulated increased research for fishmeal replacement (FMR) using plant, fishery, confectionary, corn and sugar cane from the ethanol production industry, etc. products and by-products. The most promising FMR ingredients are single cell proteins (SCP) using bacteria, yeast and microalgae as sources. This is a review of our research using bacterial and yeast based SCP ingredients as attractants and FMR in diets for *L. vannamei*. Our FMR research used materials and methods developed by Texas A&M University System, University of Alabama at Birmingham and University of Sonora using laboratory facilities and clear water RAS which will be summarized in the presentation.

Summary of results of our FMR research using bacterial and yeast based SCP are as follows:

- SCP has potential of reducing dietary protein requirement in commercial shrimp feeds to less than 20% protein.
- SCP has potential of reducing dietary vitamin, zinc and copper requirements to less than 50% of dietary requirement for these nutrients in the absence of SCP.
- About 30% FMR using either yeast or bacterial based SCP significantly increases growth to over 2.5 gms/week and decreases FCR to less than 1.8 as compared to control diet

containing 21.4% FM giving growth of about 2.2 gms/week and a FCR of about 2.7 for conditions of this research using clear water RAS.

- About 80% FMR using bacterial based SCP significantly increases growth to over 2.5 g/week and decreases FCR to less than 1.8 as compared to control diet containing 21.4% FM giving growth of about 2.2 g/week and a FCR of about 2.7 for conditions of this research using clear water RAS.
- The final shrimp weight of the 30% and 80% FMR experiments using SCP was over 20 grams with an average survival of over 95%.
- 100% FMR using a SCP containing 90% bacterial base and 10% yeast base SCP resulted in a significant increase in growth of about 2.35 g/week as compared to a growth of about 2.05 g/week for shrimp fed a commercial diet containing 21.4% FM.
- 100% FMR using a SCP containing 90% bacterial base and 10% yeast base SCP resulted in an increase in growth of about 2.35 g/week as compared to a growth of about 2.25 g/week for shrimp fed a commercial diet containing a FMR of a diet containing 100% bacterial based SCP.
- 100% FMR diets containing a mixture of 20% FM, 10% yeast base SCP and 70% bacterial base SCP, and 10% FM and 90% bacterial base SCP, and 100% bacterial based SCP resulted in shrimp tail muscle weight of about 8 g for shrimp having an average final weight of about 16 g as compared to shrimp tail weights of about 6.4 g for shrimp having a final weight of about 14.5 g fed a control diet with 0% SCP and 21.4% FM.
- Attractability of bacterial base SCP is greater than yeast base SCP; attractability of a diet containing 3% bacterial base SCP or squid meal is significantly greater than a diet containing 3% FM. Attractability of diets with about 30% FMR with yeast base and bacterial base SCP is significantly greater than a commercial diet containing 21.4% FM.

In conclusion, we have been successful for 100% FMR by SCP in shrimp diets and (1) a mixture of 10% yeast base and 90% bacterial base SCP 100% FMR results in greater growth than bacterial base SCP 100% FMR and (2) increase in growth performance with 100% FMR can in part be explained by an increase in attractability, and unknown chemoattractants, nucleotides, non-essential amino acids, dipeptides, bioamines, growth factors, etc.

Keywords: Bacteria, yeast, *single cell proteins*, *attractants*, *fish meal replacement*, *shrimp feeds*

Uso de Alimentos no Convencionales en Acuicultura: Estudios Realizados en la Universidad Federal De Rio Grande –FURG

Marcelo Borges Tesser^{1*} y Victor Torres-Rosas²

¹Universidade Federal do Rio Grande-FURG, Instituto de Oceanografia, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos. ²Universidade Federal do Rio Grande-FURG, Instituto de Oceanografia, Laboratório de Carcinocultura. *marcelotesser@furg.br

Resumen

La producción acuícola ha ido creciendo en todo el mundo y por consiguiente la producción de raciones para alimentar los organismos. El incremento para satisfacer la demanda genera una mayor presión sobre diversos insumos para la fabricación de raciones. Entre ellos, los alimentos procedentes de la agricultura y de la pesca. Este artículo tiene como objetivo señalar algunos estudios realizados por la FURG sobre el uso de alimentos no convencionales para la fabricación de raciones para organismos acuáticos.

Palabras clave: *alimentos alternativos, harina de pescado, sustentabilidad*

Introducción

La producción acuícola ha ido creciendo en todo el mundo. Quizás el principal motivo de esto es el aumento de la demanda de consumo de pescado, como se muestra en los datos de la FAO (FAO, 2020). Por lo tanto, la acuicultura tiene la gran responsabilidad de proporcionar alimentos de buena calidad, ya que las poblaciones de peces suelen estar por encima de su capacidad de explotación. Tacon y Metian (2013) consideran que la expansión de la acuicultura es fundamental para la nutrición humana.

Dentro de la producción acuícola, encontramos varios sistemas de producción adaptados a diferentes condiciones (económicas, sociales y ambientales). Podemos encontrar modelos "simples" en los que hay poca intervención humana en el proceso de producción, por ejemplo, la producción de carpa filtradora cultivada en baja densidad (es decir, sistemas extensivos), hasta procesos de producción más "complejos" en los que hay una gran intervención humana, como la producción de tilapia en tanques de red (sistemas intensivos). Recientemente, estamos experimentando un incremento en la producción de organismos acuáticos con mayor intervención humana en el proceso de cultivo con el claro objetivo de incrementar la productividad. Así, animales que hasta entonces se producían sin el uso de ración, ahora se producen con algún tipo de alimento exógeno al medio de cultivo. Por tanto, el uso de raciones para la producción acuícola ha crecido para satisfacer dicha demanda.

Datos recientes de la FAO (FAO, 2020) muestran que la producción acuícola de especies alimentadas con raciones supera el volumen de las especies no alimentadas. El aumento de esta producción de raciones para satisfacer la demanda genera una mayor presión sobre diversos insumos para la fabricación de raciones. Entre ellos, los alimentos procedentes de la agricultura y que también son utilizados por otros sectores de la producción animal. Naylor *et al.* (2020) mencionan un incremento en el uso de alimentos de origen vegetal terrestre en raciones para organismos acuáticos. Estos autores también señalan que el incremento en el uso de soja en la alimentación animal, por ejemplo, puede estar relacionado con una mayor deforestación para incrementar la producción de este insumo. Troell *et al.* (2014) señalan que habrá mayor competencia por la soja, el maíz y el trigo ya que se utilizan no solo para la acuicultura, sino para la alimentación de animales terrestres, además de ser utilizados por la industria bioenergética.

Otro punto que conviene discutir es el uso de productos pesqueros (harina y aceite de pescado). El crecimiento de la acuicultura alimentada con ración ha resultado en un aumento en la demanda de estos insumos, que por extensión ha resultado en un aumento en sus precios (FAO, 2020). El uso de estos insumos ya ha sido objeto de múltiples estudios (Bandara, 2018; NRC, 2011; Tacon y Metian, 2008) debido a problemas relacionados con el uso del pescado capturado y reducido a harina y aceite de pescado, para ser incluido en los alimentos para la acuicultura, ya sea por motivos ambientales, económicos o sociales.

Recientemente, Tacon *et al.* (2021) publicó un artículo donde los autores discuten los puntos que deben perseguirse para una actividad acuícola más sostenible. Entre los diferentes puntos planteados por los autores, hay dos que intentamos estudiar en nuestra Universidad. El primero es la prohibición del uso de ingredientes provenientes de la pesca no sostenible (harina, aceite de pescado, hidrolizados de pescado, etc.), es decir, buscar sustitutos de estos insumos. El segundo punto sería reducir la huella de carbono mediante el uso de fuentes de alimentos disponibles localmente.

En este capítulo abordaremos las actividades desarrolladas en el Laboratorio de Nutrición de Organismos Acuáticos de la FURG, que están en línea con dos puntos planteados por el artículo de Tacon *et al.* (2021) buscando alimentos alternativos o no convencionales para la acuicultura.

Floco Microbiano

La producción de organismos acuáticos en sistemas de biofloc aparece como una alternativa para mejorar la sostenibilidad productiva (Crab *et al.*, 2012). Al proporcionar una buena relación C / N, el amoníaco se puede convertir en biomasa bacteriana, mejorando así la calidad del agua. Así, es posible reducir la cantidad de agua para la producción acuícola (Krummenauer *et al.*, 2014) además de brindar la presencia de agregados microbianos (bioflocs) suspendidos en el medio y que pueden servir como alimento suplementar para los animales en producción (Krummenauer *et al.*, 2020). La calidad nutricional de los bioflocs está relacionada con varios factores como la calidad de la fuente de carbono introducida, factores ambientales, el animal cultivado, entre varios otros factores. Es de destacar que existen varios estudios que muestran, por ejemplo, que los camarones producidos en sistemas

biofloc tienen su sistema inmunológico y su sistema antioxidante mejorado debido a la presencia de varios micronutrientes (Souza *et al.*, 2019).

Los bioflocs, además de consumirse de forma endógena, es decir, filtrados de la columna de agua por los organismos cultivados, siempre y cuando tengan capacidad de filtración, se pueden utilizar de otra forma. Como la capacidad de producción de bioflocs en el sistema es mucho mayor que la capacidad de los animales para utilizarlo como alimento, existe la necesidad de filtrar el medio, eliminando así el exceso de bioflocos, devolviendo el agua al tanque de producción (Gaona *et al.*, 2016). Esta biomasa extraída tiene un gran potencial para ser utilizada como fuente de alimento para organismos, dadas las cualidades nutricionales que contiene.

Kuhn *et al.* (2009) informa que los bioflocs producidos en biorreactores podrían ser fuentes alternativas a la harina de pescado y la harina de soja en la alimentación de camarones. Así, realizamos un estudio con el objetivo de reemplazar la harina de pescado por el biofloc recolectado de un tanque de producción de camarón *Litopenaeus vannamei* y concentrado de proteína de soja en raciones para juveniles de *L. vannamei* (Bauer *et al.*, 2012). Se probaron cinco dietas, un control sin remplazo de harina de pescado y otras 4 con niveles de sustitución crecientes de la harina de pescado por bioflocos y concentrado de proteína de soja (sustitución de 25, 50, 75 y 100%). En estos niveles de sustitución, se utilizó la inclusión de (0, 7, 14, 21 o 28% de bioflocs respectivamente). Observamos que no hubo cambios en los parámetros de crecimiento entre los diferentes tratamientos probados. A pesar de que los bioflocos aportan menor cantidad de proteína que el concentrado de proteína de soja en las dietas, el uso de bioflocos en las raciones se puede señalar como una forma de mejorar la sostenibilidad de la producción acuícola.

Spirulina, Micro e Macroalgas

La utilización de algas en la acuicultura es una práctica común actualmente sobre todo en el área de larvicultura (Benemann, 1992), en el cultivo de moluscos, y en dietas experimentales para peces. Pero su aplicación a dietas comerciales para etapas posteriores a la larvicultura aún no es una realidad. Las algas son la base de toda cadena trófica para organismos acuáticos son comúnmente asociadas con la nutrición, ya que sus propiedades nutricionales abarcan una gama amplia de macro y micro elementos deseados en dietas acuícolas (Kaprapu, 2018).

Algunos elementos nutricionales destacados son: los valores y configuraciones proteicas (Becker, 2007), cantidad y calidad de ácidos grasos poliinsaturados (Patil *et al.*, 2007), carotenoides, vitaminas y minerales (Gong y Bassi, 2016).

A pesar de que las algas tienen una composición rica en aminoácidos y ácidos grasos esenciales, la industria de producción de ración aún no la ha integrado por completo en sus formulaciones, principalmente por que la producción de microalgas puede llegar a ser muy costosa (Norsker *et al.*, 2011). Sin contar que sus propiedades nutricionales son ampliamente cotizadas por la industria farmacéutica y de consumo humano (Zhang *et al.*, 2014). Lo que las convierte en insumos caros para la producción de raciones y consecuentemente de organismos acuáticos. Sin embargo, algunas industrias las utilizan ya que brindan atractabilidad al alimento, por su alto contenido de carotenoides (astaxantina) para dar color al filete de pescado, y sus altos valores de ácidos grasos omega-3 (DHA, EPA y ARA) (Glencross *et al.*, 2007; Nwoba *et al.*, 2020) sumado a esto brindan valor nutricional al filete y cubren los requerimientos nutricionales de peces marinos (Rosas *et al.*, 2019a). Por tanto, nuestro laboratorio ha realizado la mayoría de su investigación con *Gracilaria dominguis* (Macroalga) y *Arthrospira platensis* (Microalga).

Las algas rojas y principalmente *G. dominguis* son consideradas fuentes interesantes de nutrientes para la alimentación animal debido a la presencia de compuestos bioactivos estructuralmente diversos con gran potencial farmacéutico (Cardozo *et al.*, 2007). Esta macroalga se puede utilizar como fuente de aminoácidos y ácidos grasos esenciales en la dieta animal (Gressler *et al.*, 2010). Su utilización en dietas de peces marinos (*Mugil liza*) demostró que a partir de 5% de esta macroalga en la dieta puede estimular la inmunidad no específica de peces. También fue demostrado, que más de 10% de inclusión acarrea problemas en el crecimiento, en el factor de conversión alimenticia y en la tasa de eficiencia proteica, esto probablemente por su alto contenido de polisacáridos sin almidón que pueden presentarse como un factor antinutricional (Mendonça *et al.*, 2019).

Dentro de todas las microalgas, la *Spirulina* se destaca como la de mayor contenido proteico (hasta 70%), lo que la convierte en un ingrediente potencial para substituir a la harina de pescado (Habib *et al.*, 2008). Además, es una rica fuente de antioxidantes tales como beta-caroteno, zeaxantina, ficocianina y ergotioneína entre otras (Habib *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2013). Su valor proteico y contenido de antioxidantes han creado dos vertientes para su

utilización; la primera como una fuente proteica para dietas acuícolas, consistiendo en el intercambio parcial o total (10 a 100% de sustitución) de una fuente proteica (p.ej. harina de soya) por su equivalente en *Spirulina* para evaluar su efecto en parámetros zootécnicos de la especie objetivo; la segunda como un alimento funcional, donde se incluye en dietas acuícolas en pequeñas cantidades (0.1-10% del total del alimento) con el fin de evaluar sus efectos en el sistema antioxidantes, inmunoestimulante, reproductor o coloración de la especie objetivo (Ravi *et al.*, 2008; Rosas *et al.*, 2019d).

La utilización de la *Spirulina* como sustituto de fuentes proteicas en organismos acuáticos es amplia. La sustitución principalmente va dirigida hacia el remplazo de harina de pescado y secundariamente a la sustitución de fuentes proteicas de origen vegetal. Pero, substituir harina de pescado ha sido estudiado ampliamente, ya que este ingrediente es rico en algunos de los aminoácidos esenciales más limitantes tales como lisina e histidina (Habib *et al.*, 2008), así como ácidos grasos poliinsaturados (n-3), lo que lo convierte en un gran desafío (Rosas *et al.*, 2019c). El alto valor nutritivo de la *Spirulina*, la convierte en un posible candidato para este remplazo. Los porcentajes de remplazo estudiados son variados, aunque se ha demostrado que el 100% de remplazo de harina pescado por *Spirulina* disminuye el crecimiento y puede provocar altas mortalidades en peces y camarones, esto se puede explicar porque la *Spirulina* es deficiente en lisina, histidina y metionina (Macias-Sancho *et al.*, 2014; Rosas *et al.*, 2019a), lo que provoca déficit de aminoácidos cuando el organismo que la consume intenta sintetizar sus propias proteínas e inclusive cuando se ha demostrado beneficios en el sistema inmune y antioxidante en ese nivel de sustitución (100%), sus beneficios pueden ser enmascarados por las deficiencias que ocasiona (Rosas *et al.*, 2019^a; Rosas *et al.*, 2019b). Por otro lado, la sustitución parcial de harina de pescado por *Spirulina* en hasta un 50% ha demostrado beneficios superiores a los obtenidos en dietas control para diferentes especies de peces y crustáceos. Pero no solo es importante el éxito en la sustitución parcial, al mismo tiempo esta sustitución ha demostrado tener importantes beneficios en el crecimiento y parámetros zootécnicos, así como beneficios en parámetros sanguíneos, parámetros colorimétricos, sistema antioxidante, entre otros (Macias-Sancho *et al.*, 2014; Rosas *et al.*, 2019a; Rosas *et al.*, 2019b).

La utilización de *Spirulina* como suplemento alimenticio ha sido ampliamente documentada, pues esta microalga es un organismo rico en compuestos bioactivos (Gershwin y Belay

2007). Por tanto, saber cual es el mínimo porcentaje de inclusión que proporcione beneficios es una prioridad. Su utilización en dosis tan pequeñas como 10 mg día⁻¹ han probado tener efectos positivos en la inmunidad de tilapias (Regap *et al.*, 2012). Dietas con 2 y 4% de *Spirulina* fueron comparados con el uso de betacaroteno en dietas de lisas, los resultados demostraron que pequeñas inclusiones mejoran el sistema antioxidante, la coloración del camarón y parámetros productivos (Rosas *et al.*, 2019c).

Finalmente, este producto es un ingrediente que no puede competir con los costos actuales de la harina de pescado (FAO, 2016), por lo que substituir un porcentaje de la harina de pescado elevaría los costos y consecuentemente disminuiría la rentabilidad de la acuicultura. Por otro lado, la inclusión de pequeñas cantidades en el alimento (10 mg – 2% de inclusión) podrían incrementar la rentabilidad si traducimos esta al incremento en el ganancia de los parámetros productivos, tales como crecimiento y sobrevivencia (Rosas *et al.*, 2019d). Por tanto, la utilización de microalgas como herramientas que mejoren la calidad de los parámetros productivos de manera indirecta mediante el incremento de la respuesta antioxidante o inmune podría ser el futuro de la nutrición acuícola.

Hidrolizados de pescado

De acuerdo con la FAO (2020), la producción de organismos acuáticos en el año 2018 fue de 178 millones de toneladas, de las cuales 80% fueron destinadas al consumo humano. Sin embargo, esta cantidad puede ser sobreestimada si consideramos que aproximadamente el 50% de los organismos acuáticos está conformado por piel, esqueleto (o exoesqueleto), vísceras, cabeza, etc., que puede ser calificado como desperdicio (Bechtel *et al.*, 2003). Estos descartes pueden generar un costo adicional de producción si no se tiene un propósito adecuado para ellos (Peter y Clive, 2006), sin considerar el impacto ambiental generado por la degradación de estos sub productos a gases atmosféricos (Nawaz *et al.*, 2020). Por el contrario, pueden ser considerados sub-productos alimenticios y mediante un procesamiento extra podrían convertirse en un valioso producto (He *et al.*, 2013). Aproximadamente el 10 - 20% de este desperdicio es proteína, por tanto, esta proteína puede convertirse en un ingrediente de interés productivo.

La hidrólisis, es la desestructuración de proteínas de pescado que se descomponen en péptidos. Dicha degradación puede realizarse químicamente (ácido o básica) o

biológicamente (usando enzimas) (Pasupuleti y Braun, 2010; Zamora-Sillero *et al.*, 2018a). Como resultado de este proceso, los hidrolizados de pescado pueden generar productos de valor agregado como, colágeno, gelatina, aceites, aminoácidos y péptidos activos (Ghaly *et al.*, 2013). Los péptidos bioactivos se han definido como componentes derivados de alimentos (naturales o enzimáticos) que, además de su valor nutricional, ejercen un efecto fisiológico en el organismo (Vermeirssen *et al.*, 2004). Para generar actividad biológica, los péptidos, que son inactivos en la estructura de la proteína original, deben ser liberados por proteólisis (digestión *in vivo*) o hidrólisis (*in vitro* por enzimas). Así, los péptidos resultantes pueden poseer actividades biológicas tales como actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, entre otras (Zamora-Silleiro *et al.*, 2018a).

Con desperdicios de carpa (*Cyprinus carpio*) fueron elaborados hidrolizados proteicos elaborados mediante hidrólisis enzimática, posteriormente fue analizado el potencial antioxidante de este sub-producto con éxito en el control de daños contra radicales peroxil en células del hipocampo (Zamora-Sillero *et al.*, 2018b). Posteriormente fueron utilizados tales hidrolizados en dietas de pez zebra (*Danio rerio*), donde se verificó una reducción en la peroxidación de lípidos musculares, lo que implica que su uso podría mejorar la calidad y vida útil de los filetes de pescado; y se registró una disminución en la peroxidación de lípidos cerebrales (Zamora-Sillero *et al.*, 2019)

Aglutinantes (pectina)

Brasil es uno de los mayores productores de naranjas del mundo, con más del 90% de la producción destinada a la fabricación de jugos. De esta forma, se genera una gran cantidad de biomasa como subproducto que puede destinarse a la producción de pulpa de cítricos, melaza y pectina. Los derivados de la producción de jugo de naranja se utilizan ampliamente en la nutrición de rumiantes, pero no en el pescado. En los seres humanos, los estudios muestran que la pectina puede reducir los niveles de glucosa y colesterol en sangre (Lunn y Buttriss, 2007). Nuestro trabajo estudió la posibilidad, por primera vez, de incluir pectina como aglutinante en raciones para juveniles de *Mugil liza* (Ramos *et al.*, 2015) evaluando su inclusión en 4, 8 y 12% de una dieta. Los resultados demuestran que no existen diferencias entre los diferentes niveles probados y el control (sin la inclusión de pectina). Tampoco hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos probados para la concentración de colesterol y

triglicéridos hepáticos. En cuanto al glucógeno, se observó una mayor deposición en los hígados de los peces alimentados con una dieta que contenía un 12% de inclusión de pectina. También se observó a través de cortes histológicos del intestino que los peces alimentados con 8 y 12% presentaban patologías relacionadas con el proceso inflamatorio del epitelio intestinal. Sin embargo, esta imagen no fue suficiente para reducir el crecimiento de los animales. Por tanto, las inclusiones superiores al 8% deberían evaluarse mejor. Este tipo de resultado es de gran importancia ya que este insumo es abundante y, a menudo, subexplotado.

Açaí

En años recientes ha aumentado el interés de la población por ingredientes que puedan servir como alimentos funcionales. Por ello, existe un interés en frutos de origen amazónicos, tales como el burití y el acaí. El acaí (*Euterpe oleracea*) es una palmera perteneciente a la familia *Arecaceae* originaria de América del Sur nativo de la cuenca del Amazonas, considerada un producto alimenticio típico brasileño de gran importancia económica. De acuerdo con el IGBE (2020), sólo en Brasil la producción de acaí en 2020 alcanzó 220 millones de toneladas. Principalmente su comercialización se hace a través de pulpa liofilizada, secada al sol o en estufas (Lucas *et al.*, 2018).

La parte comestible del acaí, la pulpa, constituye alrededor del 32% de la masa total del fruto y la semilla el 68% restante (Yuyama *et al.*, 2011), del cual la semilla tiene un contenido superior al 48% de Carbono (Teixeira *et al.*, 2006). La composición centesimal de la pulpa de acaí demuestra ser un producto rico en lípidos (53.3%) siendo la mayoría de estos ácidos grasos saturados y monosaturados (60 y 14% respectivamente) (Batista *et al.*, 2016), su valor proteico es de 10.6%, siendo su principal aminoácido limitante la metionina (de Lima Yamaguchi *et al.*, 2015; Lucas *et al.*, 2018). Pero, la importancia del acaí recae en sus más de 90 biocompuestos nutricionales, de entre los cuales el 31% está formado por flavonoides, seguidos de compuestos fenólicos (23%), lignoides (11%) y antocianinas (9%) (de Lima Yamaguchi *et al.*, 2015), estas últimas son un grupo de flavonoides caracterizadas por dar el color morado en diversos alimentos. Además, el acaí es rico en tocoferoles y vitamina E (Darnet *et al.*, 2011). Gracias a los compuestos bioactivos antes mencionados, el acaí es hoy día considerado un alimento funcional. Y él, como otros ingredientes, ha despertado el interés de las industrias farmacéuticas para humanos y por tanto el interés de la nutrición acuícola

de la misma manera (Costa *et al.*, 2013), ya que su uso como ingrediente acuícola puede ser una herramienta potencial en cultivos intensivos (Oliva-Teles, 2012).

El acaí ha sido incluido en las dietas de organismos acuáticos principalmente de dos formas: a) En forma de harina liofilizada; y b) En forma de aceite de acaí. Al ser una fuente de lipídica, el aceite de acaí ha conseguido substituir con éxito el uso de aceite de pescado en dietas de camarón, al mismo tiempo confiriéndoles mejoras en la coloración, producto de una mayor retención de flavonoides en el musculo, lo que podría incrementar su valor en el mercado (Silva *et al.*, 2020), también en tilapias la sustitución de aceite de pescado demostró un incremento en la respuesta antioxidante de la enzima super oxido dismutasa y respuesta antioxidante total (Leite *et al.*, 2020); Ambos experimentos sin afectar el desempeño zootécnico de los organismos. Otro punto interesante es la acumulación de los flavonoides que provienen del aceite de acaí en los bioflocos bacterianos, pues como es sabido los bioflocos pueden llegar a ser una importante fuente de alimento para camarón (Wasielesky *et al.*, 2006). Por otro lado, la utilización de acaí liofilizado en dietas ha demostrado que puede ser incluido hasta un valor de 10% de inclusión total en la dieta sin afectar el crecimiento de camarones (Colombo *et al.*, 2019; Schmitz *et al.*, 2020), al mismo tiempo indujo efectos positivos en el sistema antioxidante como el incremento de la actividad de la enzima glutatión transferasa y el aumento de los niveles de glutatión reducido (GSH) y la disminución de la peroxidación lipídica (niveles de TBARS) en hepatopáncreas y músculo (Colombo *et al.*, 2019; Schmitz *et al.*, 2020). Así mismo, el acaí en dietas de camarón incrementa la resistencia a la exposición aguda de amonio en branquias y disminuye el daño en branquias causado por eventos de hipoxia (Colombo *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2020). Ya en peces de agua dulce, fue demostrado que el hidrolizado de acaí puede disminuir la peroxidación lipídica hasta en un 60% (da Silva *et al.*, 2021). Más investigaciones son necesarias para explorar el potencial del acaí en la acuicultura, ya que ha dado excelentes resultados como estimulador del sistema antioxidante, por lo que sería interesante estudiar su efecto en el sistema inmune y otros.

Mejorar la eficiencia de la producción

Mejorar las tasas de crecimiento, la eficiencia alimenticia y proporcionar buenas condiciones de salud para los animales también es una estrategia para aumentar la eficiencia productiva y reducir los impactos ambientales directos e indirectos.

Para lograr esta premisa de mejorar la eficiencia productiva, los estudios sobre la morfología y fisiología del tracto digestivo son la base para futuros estudios nutricionales. Como ejemplo, podemos citar el estudio sobre la caracterización enzimática del tracto digestivo de *Paralichthys orbignyanus* lenguado realizado por nuestro grupo de estudio (Candiotta *et al.*, 2018). Asimismo, la determinación de las necesidades nutricionales son objeto de estudios en nuestro grupo. Por lo tanto, determinamos que los juveniles de lisa *Mugil liza* deben ser alimentados con 35% de proteína en la ración y que niveles más altos aumentan la tasa de excreción de amoníaco además de empeorar la tasa de eficiencia proteica (Carvalho *et al.*, 2010).

Finalmente, el uso de aditivos en las dietas para ayudar a la eficiencia productiva también fue objeto de estudios en nuestro grupo. Un ejemplo es el uso de enzimas exógenas en la ración. La inclusión de este compuesto es interesante, ya que, con el aumento de la inclusión de materia vegetal terrestre en los alimentos, se incrementan los factores antinutricionales, incluidos los polisacáridos no almidonados. Se estudiaron dos especies sobre la inclusión de un complejo que contiene diferentes carbohidrasas más fitasa, en lisas *M. liza* y en pámpo *Trachinotus marginatus*. Para la lisa, observamos que la inclusión del complejo enzimático, a pesar de no tener efectos sobre el crecimiento de los peces, redujo el daño intestinal causado por la soja (Ramos, *et al.*, 2017). En cuanto al pámpo, hubo una mejora en el crecimiento con el uso del mismo complejo enzimático probado para lisas (Simião *et al.*, 2018).

Conclusión

La acuicultura es una de las actividades de producción de alimentos con mayores tasas de crecimiento. Como vimos anteriormente, su dependencia de alimentos de buena calidad para la producción de alimentos tiende a aumentar. Tacon (2019) estima que en 2017 se utilizaron 51,23 millones de toneladas y que para 2025 este valor llegará a 73,15 millones de toneladas. Además, la mayor demanda de insumos y mayor competencia por estos mismos insumos por parte de otros sectores productivos, lo que resulta en precios elevados, y no podemos dejar de mencionar los problemas ambientales asociados al aumento del área de producción de materias primas terrestres, así como el uso de materias primas marinas (aceite y harina de pescado). Por tanto, creemos que la búsqueda de nuevos alimentos para la producción de raciones para la acuicultura debería ser una preocupación a corto plazo. También, creemos que existe una gama de sub-productos e ingredientes locales para todas las regiones productoras de acuicultura que pueden ser utilizados con éxito en dietas de organismos acuáticos.

Referencias

- Bandara T. 2018. Alternative feed ingredients in aquaculture: opportunities and challenges. *J. Entomol Zool Stud.* 6(2):3087–3094.
- Batista, C. D. C. R., de Oliveira, M. S., Araújo, M. E., Rodrigues, A. M., Botelho, J. R. S., da Silva Souza Filho, A. P. Junior, R. N. C. (2016). Supercritical CO₂ extraction of açai (*Euterpe oleracea*) berry oil: Global yield, fatty acids, allelopathic activities, and determination of phenolic and anthocyanins total compounds in the residual pulp. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 364-369.
- Bauer, W. Prentice-Hernandez, C.; Tesser, M.B.; Wasielesky, W.; Poersch, L.H. 2012. Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 342–343, p. 112-116. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.023>
- Bechtel, P. J. (2003). Properties of different fish processing by-products from pollock, cod and salmon. *Journal of Food Processing and Preservation*, 27(2), 101–116.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), 207-210.
- Benemann, J. R. (1992). Microalgae aquaculture feeds. *Journal of Applied phycology*, 4(3), 233-245.
- [Candiotto, F.B.; Freitas, A.C.V.; Neri, R.C.A.; Bezerra, R.S; Vieira, R.R.; Sampaio, L.A.; Tesser, M.B. 2018. Characterization of digestive enzymes from captive Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. Brazilian Journal of Biology, v.78, 281-288.](#)
- Cardozo, K. H., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., & Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1-2), 60-78.
- Carvalho, C.V.A.; Bianchini, A.; Tesser, M.B.; Sampaio, L.A. (2010). The effect of protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil platanus* (Günther). *Aquaculture Research*, v. 41, p. 511-518.
- Colombo, G. M., dos Santos Simião, C., Schmitz, M. J., Pedrosa, V. F., Romano, L. A., Tesser, M. B., ... & Monserrat, J. M. (2020). The role of açai (*Euterpe oleracea* Mart. 1824) as a chemoprotective agent in the evaluation of antioxidant defence, oxidative damage and histology of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) exposed to ammonia. *Aquaculture Research*, 51(4), 1551-1566.
- Costa, A. G. V., Garcia-Diaz, D. F., Jimenez, P., & Silva, P. I. (2013). Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red–black berries. *Journal of functional foods*, 5(2), 539-549.
- Crab, R.; Defoirdt, T.; Bossier, P. (2012). Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356-357, p.351-356. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.046>
- da Silva, T. V., Torres, M. F., Sampaio, L. A., Hamoy, M., Monserrat, J. M., & Barbas, L. A. L. (2021). Dietary *Euterpe oleracea* Mart. attenuates seizures and damage to lipids in the brain of *Colossoma macropomum*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1-14.
- Darnet, S., Serra, J. L., Rodrigues, A. M. C., & Silva, L. H. M. (2011). A highperformance liquid chromatography method to measure tocopherols in assai pulp (*Euterpe oleracea*). *Food Research International*, 44, 2107–2111.

- de Lima Yamaguchi, K. K., Pereira, L. F. R., Lamarão, C. V., Lima, E. S., & da Veiga-Junior, V. F. (2015). Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. *Food chemistry*, 179, 137-151.
- FAO. (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. FAO, Roma. 224 pp
- Food and Agriculture Organization FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>
- Gaona, C.A.P.; Serra, F.P.; Furtado, P.S.; [Poersch, L.H.](#); Wasielesky, W. 2016. Biofloc management with different flow rates for solids removal in the *Litopenaeus vannamei* BFT culture system. *Aquaculture International*, v. 24, p. 1263-1275.
- Gershwin M.E., Belay A. (Eds.) (2007). *Spirulina in Human Nutrition and Health*. Taylor and Francis, London.
- Ghaly A.E., Ramakrishnan V.V., Brooks M.S., Budge S.M., Dave D. (2013). Fish processing wastes as a potential source of proteins, amino acids and oils: a critical review. *J. Microb Biochem Technol* 5:107–129
- Glencross, B. D., Booth, M., Allan, G. L. (2007). A feed is only as good as its ingredients—a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture nutrition*, 13(1), 17-34.
- Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology advances*, 34(8), 1396-1412.
- Gressler, V., Yokoya, N. S., Fujii, M. T., Colepicolo, P., Mancini Filho, J., Torres, R. P., & Pinto, E. (2010). Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food chemistry*, 120(2), 585-590.
- Habib, M. A. B. (2008). Review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. Food and agriculture organization of the united nations.
- He, S., Franco, C., & Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50(1), 289-297.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE. (2020). v4.6.11 <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/16/12705>
- Kaparapu, J. (2018). Application of microalgae in aquaculture. *Phykos*, 48(1), 21-26.
- Krummenauer, D.; Samocha, T.M. ; Poersch, L. H. ; Lara G. R. ; [Wasielesky JR, Wilson](#). (2014). The Reuse of Water on the Culture of Pacific White Shrimp, in BFT System. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 45, p. 3-14.
- [Krummenauer, D](#); Abreu, P.C.; Poersch, L.; REIS, P. A. C. P.; Suita, S.; Reis, W. G.; Wasielesky, W.J. (2020). The relationship between shrimp (*Litopenaeus vannamei*) size and biofloc consumption determined by the stable isotope technique. *Aquaculture* v. 529, p. 735635, 2020.
- Kuhn, D.D., Boardman, G.D., Lawrence, A.L., Marsh, L., Flick, G.J. (2009). Microbial flocs generated in bioreactors is a superior replacement ingredient for fishmeal or soybean meal in shrimp feed. *Aquaculture* 296, 51–57.

- Leite, T. C., Picoli, F., Lopes, D. D. A., Baldissera, M. D., Souza, C. F., Baldisserotto, B., Da Silva, A. S. (2021). The effects of açai oil addition in tilapia diets on performance, hepatic energy metabolism enzymes and antioxidant responses. *Aquaculture Research*, 52(1), 395-402.
- Lucas, B. F., Zambiasi, R. C., & Costa, J. A. V. (2018). Biocompounds and physical properties of açai pulp dried by different methods. *LWT*, 98, 335-340.
- Lunn, J.; Buttriss, J. L., (2007). Carbohydrates and dietary fiber. *Nutr. Bull.* 32, 21–64.
- Macias-Sancho, J., Poersch, L. H., Bauer, W., Romano, L. A., Wasielesky, W., & Tesser, M. B. (2014). Fishmeal substitution with *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: effects on growth and immunological parameters. *Aquaculture*, 426, 120-125.
- Mendonça, A. J. C. D., Rosas, V. T., Monserrat, J. M., Romano, L. A., & Tesser, M. B. (2019). The inclusion of algae *Gracilaria domingensis* in the diet of mullet juveniles (*Mugil liza*) improves the immune response. *Journal of Applied Aquaculture*, 31(3), 210-223.
- National Research Council. (2011). Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington: The National Academies Press; p. 376.
- Nawaz, A., Li, E., Irshad, S., Xiong, Z., Xiong, H., Shahbaz, H. M., Siddique, F. (2020). Valorization of fisheries by-products: Challenges and technical concerns to food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 34-43.
- Naylor, R.; Hardy, R.W.; Buschmann, A.H.; Bush, S.R.; Cao, L.; Klinger, D.H.; Little, D.C.; Lubchenco, J.; Shumway, S.E.; Troell, M. (2020). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, v. 591, p. 551-563.
- Nguyen, T. H., Nagasaka, R., & Ohshima, T. (2013). The natural antioxidant ergothioneine: resources, chemical characterization, and applications. In *Lipid Oxidation* (pp. 381-415). AOCS Press.
- Norsker, N. H., Barbosa, M. J., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2011). Microalgal production—a close look at the economics. *Biotechnology advances*, 29(1), 24-27.
- Nwoba, E. G., Ogbonna, C. N., Ishika, T., & Vadiveloo, A. (2020). Microalgal pigments: a source of natural food colors. In *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products* (pp. 81-123). Springer, Singapore.
- Oliva-Teles, A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of fish diseases*, 35(2), 83-108.
- Pasupuleti, V. K., & Braun, S. (2010). State of the art manufacturing of protein hydrolysates. *Protein Hydrolysates in Biotechnology*, 11–32.
- Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., & Gislerød, H. R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, 15(1), 1-9.
- Peter, D., Clive, H. (2006). An overview of the Australian Seafood Industry. Published online. <http://aaa.ccpit.org/Category7/mAttachment/2006/Dec/13/asset000070002007202file1.pdf>
- Ragap, H.M., Khalil, R.H., Mutawie, H.H. (2012). Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2: 26–31.

- Ramos, L.R.V.; Pedrosa, V.F.; Mori, A.; Andrade, C.F.F.; Romano, L.A.; Abreu, P.C.; Tesser, M.B. (2017). Exogenous enzyme complex prevents intestinal soybean meal induced enteritis in *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) juveniles. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, p. 341-353.
- Ramos, L.R.V.; Monserrat, J.M.; Romano, L.A.; Sampaio, L.A.; Abreu, P.C.; Tesser, M.B. (2015). Effects of supplementing the diets of *Mugil liza* Valenciennes, 1836 juveniles with citrus pectin. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 31, 362-369.
- Ravi, M., Lata, S., Azharuddin, D.S., Paul, S. (2010). The beneficial effects of Spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. *Nutrition and Dietary Supplements 2*: 73–83.
- Rosas, V. T., Bessonart, M., Romano, L. A., & Tesser, M. B. (2019a). Fishmeal substitution for *Arthrospira platensis* in juvenile mullet (*Mugil liza*) and its effects on growth and non-specific immune parameters. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 32(1), 3-13.
- Rosas, V. T., Monserrat, J. M., Bessonart, M., Magnone, L., Romano, L. A., & Tesser, M. B. (2019b). Fish oil and meal replacement in mullet (*Mugil liza*) diet with Spirulina (*Arthrospira platensis*) and linseed oil. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 218, 46-54.
- Rosas, V. T., Monserrat, J. M., Bessonart, M., Magnone, L., Romano, L. A., & Tesser, M. B. (2019c). Comparison of β -carotene and Spirulina (*Arthrospira platensis*) in mullet (*Mugil liza*) diets and effects on antioxidant performance and fillet colouration. *Journal of Applied Phycology*, 31(4), 2391-2399.
- Rosas, V. T., Poersch, L. H., Romano, L. A., & Tesser, M. B. (2019d). Feasibility of the use of Spirulina in aquaculture diets. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1367-1378.
- Schmitz, M. J., Colombo, G. M., dos Santos Simião, C., Ortiz, C. R., Costa, L. D. F., da Silva, T. V. N., Monserrat, J. M. (2020). Modulation of nodularin toxicity in shrimp *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) fed with dietary açai (*Euterpe oleracea*) inclusion. *Fish & Shellfish Immunology*, 103, 464-471.
- Silva, S. M., Ramos, P. B., Buitrago, J. R., da Silva, T. V., Simião, C. S., Colombo, G. M., Monserrat, J. M. (2020). Zootechnical performance, biochemical response, and chromaticity in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) (Boone, 1931) after the inclusion of lyophilized açai (*Euterpe oleracea*) in the diet. *Aquaculture International*, 28(4), 1563-1577.
- Simião, C.S.; Ramos, L.V.R.; Mori, A.; Romano, L.A.; Monserrat, J.M.; Tesser, M.B. (2018). Use of exogenous enzymes in diets for juvenile pompano *Trachinotus marginatus*: growth and liver and intestine morphophysiology. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 44, e326. Doi 10.20590/1678-2305.2018.44.4.326.
- [Souza, D. M.](#) ; Kutter, M. T. ; [Furtado, P.S.](#) ; [Romano, L.A.](#) ; Wasielesky, W.J.; [Monserrat, J.M.](#); [Garcia, L.O.](#) (2019). Growth, antioxidant system, and immunological status of shrimp in bioflocs and clear water culture systems. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 54, p. 1-8, 2019.
- Tacon A.G.J., Metian M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture*. 285(1-4):146–158. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.08.015
- Tacon, A.; Metian, M. (2013). Fish Matters: Importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. *Reviews in Fisheries Science*, v. 2, p. 22-28.

- Tacon, A.; Metian, M.; McNevin, A.A. (2021). Future Feeds: Suggested Guidelines for Sustainable Development. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* <https://doi.org/10.1080/23308249.2021.1898539>
- Tacon, A.G.J. (2019). Trends in Global Aquaculture and Aquafeed Production: 2000–2017, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, DOI: 10.1080/23308249.2019.1649634
- Teixeira, L. B., De Oliveira, R. F., Furlan Junior, J., Campos, P. D. F., & Germano, V. (2006). *Compostagem: lixo orgânico urbano e resíduos da agroindústria do açaí*. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2006.
- [Troel, M.; Naylor, R.L.; Metian, M.; Beveridge, M.; Tyedmers, P.H.; Folke, C.; Arrow, K.J.; Barret, S.; Crépin, S.A.; Erlich, P.R.; Gren A.; Kautsky, N.; Levin, S.A.; Nyborg, K.; Osterblom, H.; Polasky, S.; Scheffer, M.; Walker, B.H.; Xepapadeas, T.; Zeeuw, A. 2014.](#) Does aquaculture add resilience to the global food system? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111 (37) (2014), pp. 13257-13263, [10.1073/pnas.1404067111](https://doi.org/10.1073/pnas.1404067111)
- Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., (2006). Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.04.030
- Yuyama, L. K. O., Aguiar, J. P. L., Silva Filho, D. F., Yuyama, K., Jesus Varejão, M. D., Fávares, D. I. T., Caruso, M. S. F. (2011). Caracterização físico-química do suco de açaí de Euterpe precatoria Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. *Acta Amazonica*, 41, 545-552.
- Zamora-Sillero, J., Gharsallaoui, A., & Prentice, C. (2018a). Peptides from fish by-product protein hydrolysates and its functional properties: An overview. *Marine Biotechnology*, 20(2), 118-130.
- Zamora-Sillero, J., Ramos, P., Monserrat, J. M., & Prentice, C. (2018b). Evaluation of the antioxidant activity *in vitro* and in hippocampal HT-22 cells system of protein hydrolysates of common carp (*Cyprinus carpio*) by-product. *Journal of aquatic food product technology*, 27(1), 21-34.
- Zamora-Sillero, J., Tavares Kütter, M., Borges Tesser, M., Monserrat, J. M., & Prentice, C. (2019). Effect of dietary common carp by-product protein hydrolysates on antioxidant status in different organs of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Nutrition*, 25(1), 110-118.
- Zhang, J., Sun, Z., Sun, P., Chen, T., & Chen, F. (2014). Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health. *Food & function*, 5(3), 413-425.

Bioencapsulación de Levadura Probiótica para Larvas de *Seriola rivoliana*

Teles, A.^{1,3}, Tovar-Ramírez, D.², Alvarez-González, C.A.¹, Guzmán-Villanueva, L.^{1,4},
Burgoin, M.², Linares-Aranda, M.², Lucero-Rivera, Y.E.²

¹Laboratorio de Acuicultura Tropical, DACBIOL-Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa-Cárdenas Km 0.5, Villahermosa, Tabasco, 96139, México. ²Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Calle Instituto Politécnico Nacional 195, La Paz, B.C.S. 23096, México. ³Departamento de Ingeniería en Pesquerías, Universidad Autónoma de Baja California Sur, Sur KM 5.5, 23080 La Paz, B.C.S., México. ⁴Cátedra - Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT.

Correo electrónico: and.teles84@gmail.com

Resumen

La actividad acuícola crece de manera exponencial, lo que implica la necesidad de alternativas a los métodos tradicionales de producción para disminuir el estrés animal y ambiental. Entre las alternativas utilizadas para el desarrollo sostenible de la actividad, está el uso de los probióticos que son capaces de modular la microbiota intestinal, estimular la respuesta inmune y la maduración del tracto digestivo de larva y juveniles de peces. Este trabajo tiene como objetivo presentar un panorama de los trabajos desarrollados con el uso de *Debaryomyces hansenii* sobre la fisiología digestiva de larvas y juveniles de peces marinos (*Mycteroperca rosacea*, *Lutjanus guttatus*), así como como la eficiencia del uso de alimento vivo como vector de *D. hansenii* para larvas de *Seriola rivoliana*. Los resultados obtenidos demuestran la eficacia en el uso de la levadura *D. hansenii* como probiótico para las larvas y juveniles de peces de interés comercial, con resultados en el incremento de la actividad de enzimas digestivas y modificación de la morfología intestinal. Los análisis de microscopía electrónica de barrido demostraron la capacidad de la levadura de pasar por el tracto digestivo de las larvas y juvenil y mantenerse viva, ya sea vía alimento inerte o vía alimento vivo a través de bioencapsulación, además, es posible observar los sitios de adhesión de la levadura en la mucosa intestinal. Con los resultados obtenidos se demuestra la posibilidad de administrar la levadura probiótica desde etapas tempranas de desarrollo lo que puede resultar en mejores índices zootécnicos y así establecer protocolos más eficientes de producción.

Palabras clave: *Debaryomyces hansenii*, enriquecimiento, alimento vivo, peces marinos.

Introducción

La acuicultura desempeña un papel fundamental a la hora de proporcionar medios de vida sostenibles y seguridad alimentaria a la creciente población mundial, por ello, se ha aplicado una intensificación de las prácticas acuícolas para mantener altos niveles de producción, lo que ha provocado un aumento del estrés de los animales acuáticos y del medio ambiente (Dawood *et al.*, 2019). Esta intensificación, hizo amplio el uso de alimentos industrializados y sustancias anti microbianas agregadas al alimento convencional con el objetivo de promover el crecimiento, sin embargo, en la actualidad, el interés de los consumidores por productos seguros y sin fármacos, y la necesidad de una acuicultura sostenible han alentado a la comunidad de investigación científica a utilizar los probióticos como una estrategia de salud respetuosa con el medio ambiente para contrarrestar las enfermedades de la acuicultura y disminuir el estrés animal y ambiental (Carnevali *et al.*, 2017; Dawood *et al.*, 2019; Vincent *et al.*, 2019).

Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas entran al sistema gastrointestinal del hospedero, se mantienen vivos y son aptos a colonizar el intestino con la finalidad de aportar salud al hospedero incrementando el balance microbiano del intestino (Gatesoupe, 1999; Buzzini y Vaughan-Martini, 2006; Schepper *et al.*, 2017). Una vez administrados son aptos a colonizar y multiplicarse en el organismo del hospedero y ejercer numerosos efectos benéficos con capacidad para modular diferentes sistemas biológicos en el hospedero, así como recuperar el equilibrio de la microbiota cuando esta se ve afectada luego del uso de antibióticos (Cross, 2002; Yukgehnaish *et al.*, 2020).

Estos aditivos han sido evaluados desde diferentes enfoques en peces, desde parámetros zootécnicos hasta a nivel molecular, y han favorecido al desarrollo, la disminución de deformidades, incremento en la respuesta inmune, maduración digestiva, la modulación de la microbiota intestinal entre otros efectos positivos en la producción de larvas y juveniles de peces (Tovar-Ramírez *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2021; Vargas-Albores *et al.*, 2021) y pueden ser suministrados de diferentes maneras, ya sea a través de baños o a través de la alimentación (Hasan y Banerjee 2020), siendo la suplementación de alimentos con probióticos considerado el mejor método para lograr el éxito en la colonización y establecimiento en el tracto,

principalmente en la etapa larval que es considerada la etapa crítica en la producción de peces en la cual la maduración del tracto digestivo no está completamente establecida.

En este ámbito, uno de los métodos para la administración de probióticos a larvas de peces de desarrollo altricial, es a través del alimento vivo, ya que son organismos capaces de tomar estas bacterias o levaduras probióticas a través de la filtración e incorporación en su tracto digestivo o por adhesión en su exterior (Ishthiaq *et al.*, 2021), éste proceso conocido como bioencapsulación o enriquecimiento.

La bioencapsulación y el enriquecimiento son técnicas que están evolucionando en la acuicultura que consisten en la incorporación de productos (ej. aditivos funcionales) en alimento vivo y que se emplean habitualmente para mejorar la calidad nutricional de los alimentos vivos mediante la integración de nutrientes en ellos y para que el aditivo funcional pueda llegar intacto a la larva, lo que posteriormente mejora el crecimiento, la supervivencia y la resistencia a las enfermedades del hospedero, (Samat *et al.*, 2020; Ishthiaq *et al.*, 2021). Este trabajo tiene como objetivo presentar un panorama de los estudios realizados en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) con la levadura *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 sobre la fisiología digestiva de larvas y juveniles de peces marinos, así como determinar la eficiencia del uso de rotíferos y metanauplios de *Artemia sp.* como vectores de la levadura probiótica para larvas de *Seriola rivoliana*.

Las levaduras como probióticos

Las levaduras son organismos ubicuos que son diseminados por los animales, el aire y las corrientes de agua, por lo que pueden ser detectadas en el tracto digestivo, tanto de peces silvestres como cultivados (Tovar-Ramírez *et al.*, 2008; Reyes-Becerril *et al.*, 2020; Angulo *et al.*, 2020; Vargas *et al.*, 2021).

Estos organismos han demostrado el potencial para producir sustancias bioactivas, como glucanos, glutatión, toxinas, enzimas, fitasa y vitaminas con aplicación en la acuicultura, la industria química, la cosmética, la alimentación y la industria farmacéutica (Ceseña *et al.*, 2021). Son aditivos populares en la acuicultura (enteras o en fracciones) como suplementos en la alimentación de los organismos como fuente de aminoácidos, proteínas y vitaminas, principalmente del complejo B, con un efecto positivo en el crecimiento y la inmunidad (Huyben *et al.*, 2018; Angulo *et al.*, 2020; Reyes-Becerril *et al.*, 2020; Ceseña *et al.*, 2021).

Otro uso dado a las levaduras en acuicultura es en el control de enfermedades (bacterias o virus) y la reducción de la aplicación de antibióticos y otros productos químicos que afectan a la resistencia de los microorganismos o a la patogénesis, pues cabe mencionar que las levaduras son resistentes a los antibióticos (Ceseña *et al.*, 2021).

A pesar de que los reportes referentes a la utilización de probióticos en acuicultura están concentrados en su mayoría en bacterias, las levaduras han demostrado también un gran uso potencial además de que éstas pueden llegar a ser centenares de veces más grandes que las bacterias, lo que puede explicar que la introducción de una pequeña población (10^4 CFU g^{-1}) a través del alimento puede inducir en efectos benéficos significantes para el hospedero (Tovar-Ramírez *et al.*, 2004; Sen y Mansell 2020; Borges *et al.*, 2021; Loh *et al.*, 2021; Vargas *et al.*, 2021).

Las levaduras han sido identificadas como parte de la microbiota normal tanto de peces silvestres como de peces cultivados y su papel en la salud y nutrición del pez ha sido abordado en la literatura, siendo utilizada tanto vivas, como enriquecedor para alimento vivo, o procesadas como ingrediente de la dieta, demostrando una colonización artificial del intestino del hospedero (Navarrete y Tovar-Ramírez, 2014).

Especies de levadura como *Candida* sp., *C. utilis*, *C. sake*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces* sp., *D. hansenii*, *Hanseniaspora* sp., *Kloeckera* sp., *Kluyveromyces* sp., *Leucosporidium* sp., *Metschnikowia* sp., *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp., *R. rubra*, *R. glutinis*, *Saccharomyces* sp., *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces* sp., *Trichosporon* sp. y *Yarrowia* sp. han sido aplicadas en la producción acuícola (Ceseña *et al.*, 2021).

Debaryomyces hansenii

De la amplia diversidad de microhongos se destaca la levadura *D. hansenii* la cual es una especie extremófila de la Familia Saccharomycetaceae, que puede ser encontrada en muchos hábitats, como en agua marina, de donde fue inicialmente aislada, queso, carne, vino, cerveza, frutas y suelo, así como en productos ricos en azúcar. Posee características promisoras para aplicaciones biotecnológicas por su oleaginidad y halotolerancia, capaz de crecer en medios conteniendo arriba de los 4 M NaCl, mientras el crecimiento de *S. cerevisiae* está restringido a medios conteniendo menos de 1.7 M NaCl. Su osmotolerancia es altamente ventajosa para varias aplicaciones biotecnológicas pues ésta permite una producción no

estéril y altas concentraciones de producto, condiciones que permiten una dramática reducción de costos en el sector agroalimentario (Breuer y Harms, 2006). Además de ser una especie de levadura conocida por sus características halotolerantes, está incluida en la lista QPS EFSA (Presunción de calidad como segura - Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria), puede resultar atractiva para aplicaciones relacionadas con piensos o alimentos (Donzella *et al.*, 2021).

El conocimiento de esta levadura es muy limitado, por ello, *D. hansenii* puede considerarse una "cenicienta" en el mundo de los microorganismos, ya que no se ha impulsado suficientemente la investigación de sus diversos aspectos destacables (Prista *et al.*, 2016). En los últimos años ha sido objeto de estudios relacionados a la fisiología digestiva, respuesta inmune, crecimiento y supervivencia de larvas y juveniles de peces marinos (Tovar-Ramírez *et al.*, 2002, 2010; Guzmán-Villanueva *et al.*, 2007; Reyes-Becerril *et al.*, 2008, 2011; Angulo *et al.*, 2017) y este aumento en el número de reportes en el uso de *D. hansenii* como probiótico (Angulo *et al.*, 2020; Reyes-Becerril *et al.*, 2020; Donzella *et al.*, 2021), nos permite conocer la capacidad de esta levadura para mejorar el crecimiento, la supervivencia y la maduración intestinal y mejorar los sistemas inmunitario y antioxidante en larvas y juveniles de peces.

Uso de *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339) en la fisiología y morfología del tracto digestivo de larvas y juveniles de peces marinos.

Han sido desarrollados estudios en el Laboratorio de Fisiología digestiva y genómica funcional del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, con el intuito de identificar los efectos del uso de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 (aislada del tracto digestivo de trucha arcoíris) sobre la fisiología digestiva de larvas y juveniles de peces marinos de interés comercial, como la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*, cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* y el pez fuerte (jurel) *Seriola rivoliana*.

Mycteroperca rosacea

Para el estudio realizado con juveniles de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*, se adicionó la *D. hansenii* (cepa CBS 8339) en el alimento microparticulado al 1.1% (Tovar-Ramírez *et al.*, 2002), por un período de 4 semanas. Se cuantificaron las enzimas lipasa, tripsina, (páncreas), pepsina (estómago) y aminopeptidasa (intestino). Se analizaron también segmentos intestinales de la parte anterior, media y posterior, para localizar y cuantificar las levaduras adheridas por microscopía electrónica de barrido (MEB). Al final del período experimental se recuperaron y cuantificaron las levaduras presentes en el intestino en medio YPD sólido (cuenta viable).

La actividad de las enzimas cuantificadas, presentaron cambios que se relacionan con la presencia de las levaduras en el alimento y sitios de fijación al tracto digestivo. Se observó que los peces alimentados con levaduras en la dieta presentaron un peso mayor, ($P < 0.05$) así como el mayor número de ciegos pilóricos ($P < 0.05$). El número de ciegos está relacionado íntimamente con la capacidad digestiva del pez, pues es aquí donde se llevan a cabo importantes funciones tales como la digestión complementaria de lípidos y carbohidratos, absorción de aminoácidos (Krogdahl *et al.*, 1999) y sobretodo, almacén temporal de enzimas digestivas activas.

La observación del epitelio intestinal con MEB, confirmó la capacidad de adhesión de la levadura al intestino de la cabrilla sardinera (Fig. 1 y 2); se observaron levaduras en los segmentos intestinales durante las 4 semanas del experimento. Estos hallazgos demuestran la capacidad de la levadura para permanecer íntegra una vez pasado por el tracto digestivo del juvenil, además de adherirse a la pared intestinal.

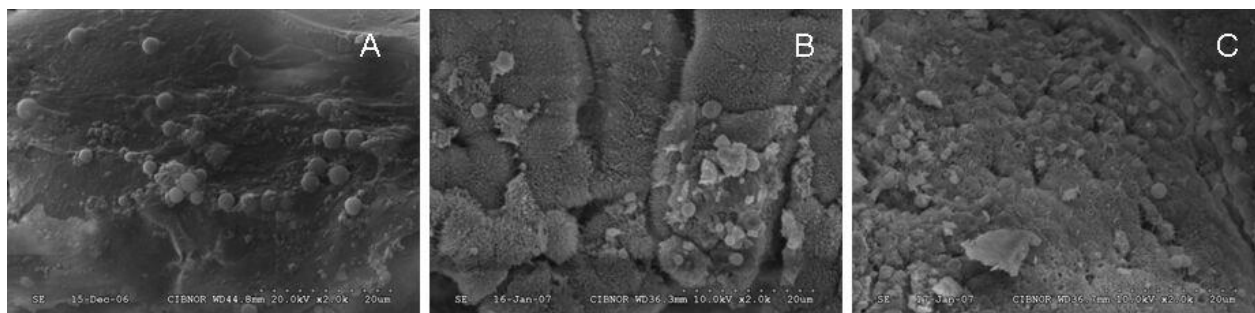


Figura 1. Presencia de levaduras *Debaryomyces hansenii* en los diferentes segmentos intestinales de juveniles de *Mycteroperca rosacea*. A) anterior; B) medio; C) posterior.

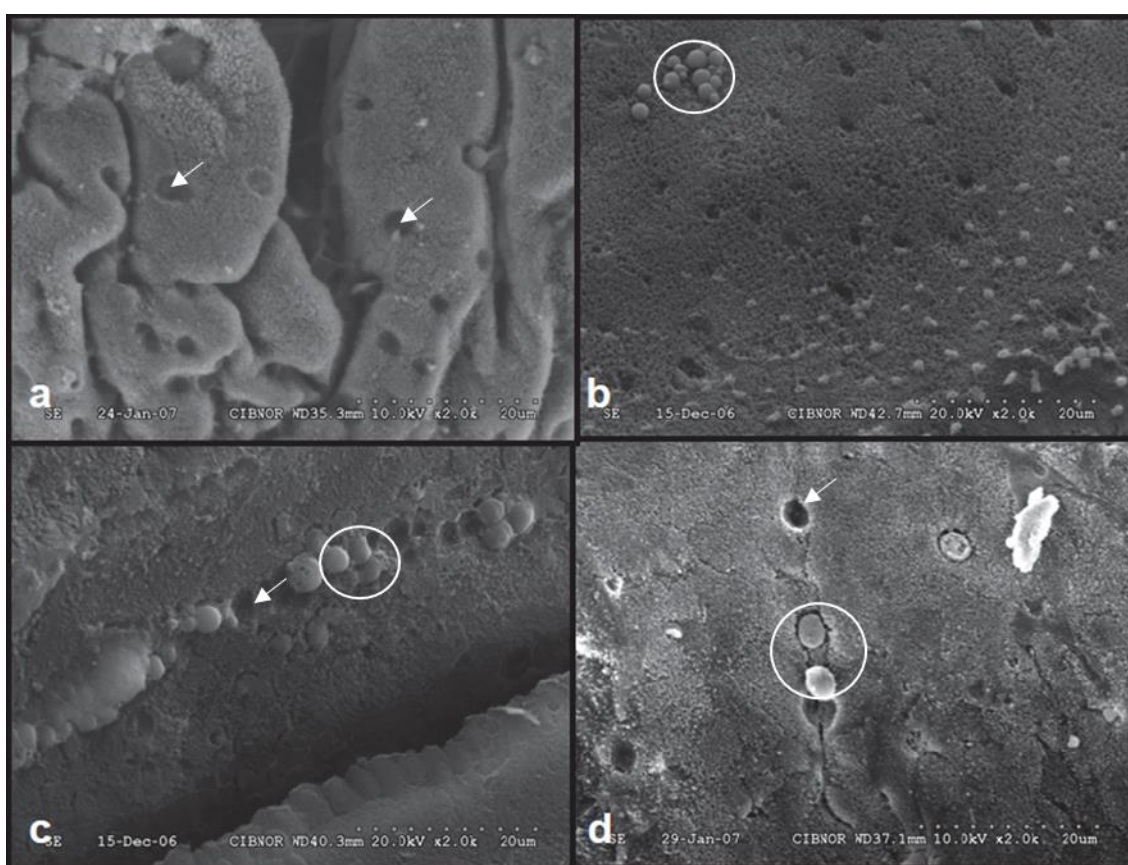


Figura 2. Marcas de los sitios de adhesión de las levaduras *Debaryomyces hansenii* en intestino posterior de juveniles de *Mycteroperca rosacea*. Las flechas indican las marcas en el intestino dejadas por las levaduras; los círculos indican la presencia de las levaduras adheridas al intestino.

Lutjanus guttatus

La posibilidad de utilizar el alimento vivo como vehículo para administración de aditivos funcionales, es de interés para la producción de larvas de peces de ontogenia indirecta, ya que desde las primeras etapas del desarrollo pueden beneficiarse de los efectos del aditivo alimentario administrado, modulando la actividad de enzimas y hormonas digestivas, desarrollo del tracto digestivo, mejora de la capacidad inmune entre otros, que repercute en la salud, mayor supervivencia y mejor desarrollo general de larvas hasta la etapa de juveniles. En este ámbito, se realizó experimento con larvas del pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*), en el cual se administró levadura *D. hansenii* (CBS 8339) vía rotífero. Este trabajo tuvo como objetivo, conocer el efecto de la incorporación de hidrolizados solubles de pescado y de la levadura *D. hansenii* incorporada a rotíferos *Brachionus rotundiformis*, sobre la expresión de genes marcadores de la maduración digestiva en larvas de *L. guttatus*.

Se utilizaron diferentes tratamientos (inanición, control, tratamiento con levadura y tratamiento con hidrolizado), se analizó la calidad de huevos y larvas, tasa de crecimiento absoluta (TCA) y supervivencia, la expresión de genes codificantes de enzimas digestivas (α -amilasa, lipasa, quimotripsina y tripsina) y hormonas del control alimenticio (Colecistoquinina; CCK, y Neuropeptido Y; NPY) en huevos y larvas de 1 y 4 días después de la eclosión (DDE).

A los 4 DDE, el tratamiento con levadura mostró diferencia significativa ($P < 0.05$) en la expresión de las enzimas digestivas lipasa y α -amilasa cuando comparado a los demás tratamientos (Fig. 3). Lo que demuestra la capacidad de *D. hansenii* sobre la modulación de la expresión de enzimas digestivas desde etapas tempranas de desarrollo y durante un corto período de administración.

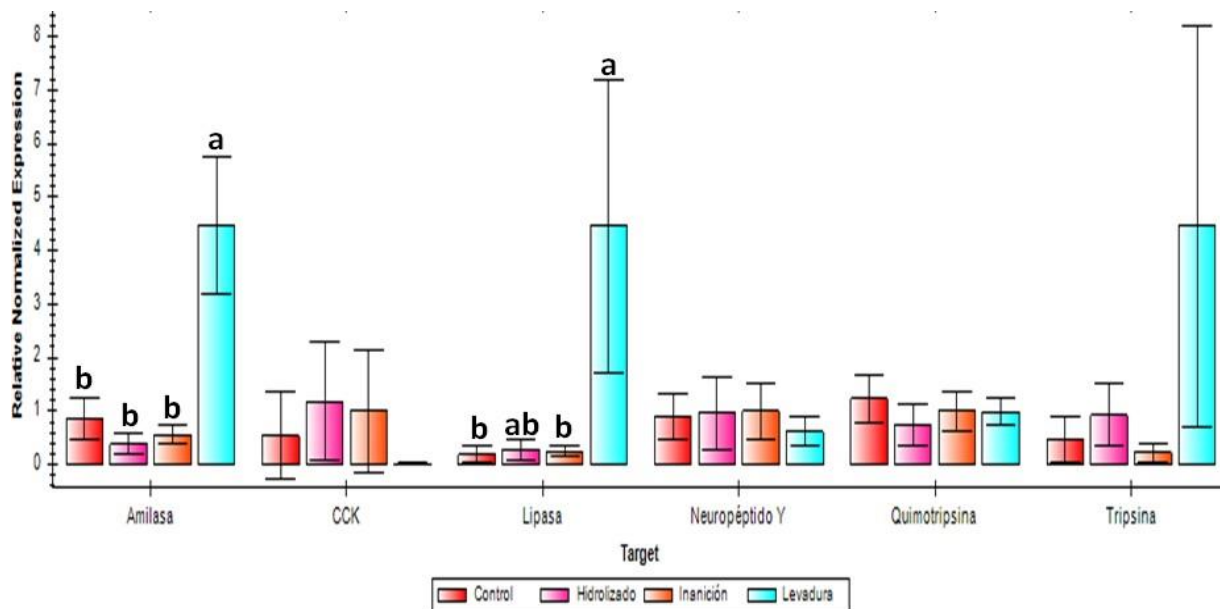


Figura 3. Análisis de expresión de genes en larvas de *Lutjanus guttatus* al 4 DDE. Los datos están representados como media \pm error estándar. Las diferentes letras indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos.

Bioencapsulación de levadura *D. hansenii* (CBS 8339) para larvas de *Seriola rivoliana*

Entre las especies con potencial de cultivo a escala comercial, está el jurel *S. rivoliana*, considerada una especie de piscicultura marina emergente (Roo *et al.*, 2014; Teles *et al.*, 2017; 2019). Son larvas altriciales que requieren de alimento vivo durante sus primeras etapas y presentan altas mortalidades durante la etapa larvaria. Como mencionado anteriormente una de las alternativas a los esquemas tradicionales de producción para aumentar las tasas de supervivencia y mejora en la salud de larvas de peces marinos, es el uso de probióticos, cuya utilización se incrementa cada vez más debido a los efectos benéficos que éstos aportan al hospedero.

Para identificar la capacidad del alimento vivo como vector de la levadura a la larva, se realizaron experimentos de bioencapsulación de rotíferos y metanauplios de *Artemia*, inoculados con *D. hansenii*.

Metodología

Producción de *Debaryomyces hansenii*.

La cepa CBS 8339 se aisló del tracto digestivo de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Andlid *et al.*, 1995). Las células se cultivaron a 30 ° C durante 24 horas en medio YPD (extracto de levadura; peptona; dextrosa) agar suplementado con ampicilina (50 mg L⁻¹). Las colonias se subcultivaron en 150 mL de medio YPD líquido con agitación a 150 rpm a 30 ° C durante 24 horas, luego se realizó una nueva incubación en matraces de 2 L con medio YPD líquido con agitación durante 24 horas. Las células se recuperaron del medio de cultivo mediante centrifugación (5 min, 1000 x g, 4 ° C).

Marcación de la levadura

Para poder observar la levadura en el interior del alimento vivo a través de microscopia de fluorescencia, se marcó la levadura con 5-DTAF (5-(4,6 diclorotriazinil) aminofluoresceína (Sigma D 0531, Madrid, España) de acuerdo con Tovar-Ramírez *et al.*, (2002). Se homogeneizaron 2 mg de DTAF en 10 ml de solución 0,05 M Na HPO₄ -0,85% NaCl luego, la solución se filtró a 0,2 mm y se manipuló en condiciones estériles. Los cultivos de levadura en medio YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa) se centrifugaron durante 10 min a 2700 x g y lo precipitado se re suspendió en la solución DTAF, luego se incubaron en un baño de agua a 37 ° C durante 2 h. Después de una segunda centrifugación, los pellets se enjuagaron en 10 ml de agua de mar mezclada con agua destilada (18 UPS), y luego se centrifugaron de nuevo. Los pellets se re suspendieron en una mezcla de 2 ml de glicerol, 4 ml de agua de mar a 36 psu y 4 ml de agua destilada. Se almacenaron alícuotas de 1 ml a -80 ° C, hasta su uso.

Alimento vivo

Para los experimentos, se utilizaron como alimento vivo rotíferos *Brachionus* sp. y *Artemia* sp. Los rotíferos fueron cultivados en tanques cilindrocónicos de fibra de vidrio a una densidad promedio de 400 rotíferos mL⁻¹, alimentados con alimento comercial Ori-One® (Skretting, Stavanger, Norway) 4 veces al día a una concentración de 0.5 g x 10⁶ rotíferos. Los quistes de *Artemia* (Biogrow, Proveedor de Insumos Acuícolas, S. A de C.V. Mazatlán, Mexico) fueron desinfectados con hipoclorito a una concentración de 20 ppm en agua dulce

por 1 hora. Una vez desinfectados, los quistes fueron transferidos a tanques de eclosión, con iluminación intensa (3000 lux), temperatura de 30 °C y fuerte aireación por 24 horas. Pasadas las 24 horas, los nauplios fueron cosechados, filtrados en tamiz de 100 µm, lavados y transferidos a los tanques de enriquecimiento por 12 horas.

Alimento vivo como vector de la levadura

Para verificar si el rotífero y la *Artemia* son vectores adecuados para la levadura, para que ésta pueda llegar intacta hasta el organismo hospedero, esto fue verificado mediante la incubación de los rotíferos y metanauplios con levaduras marcadas con DTAF. Se colectaron 100 mL de rotíferos directamente de los tanques de cultivo (400 rotíferos mL⁻¹) y se agregó la levadura (1 g de levadura/10⁶ de rotíferos), y se incubaron 100 µL en tubos Eppendorf durante los siguientes tiempos: 5, 10 y 15 minutos por triplicado.

Para la *Artemia*, se pesó 1 gramo de quiste, se hidrataron con agua dulce por una hora. Luego los quistes fueron lavados y colocados en tanque incubadora con agua de mar (36 g L⁻¹), fuerte aireación e iluminación por 24 horas. Pasadas las 24 horas los nauplios fueron cosechados, lavados con agua de mar, contados (150,000 nauplios) y sembrados en el estanque incubadora con agua de mar, aireación moderada, por otras 24 horas. Pasadas las 24 horas éstos ya eran metanauplios que fueron cosechados.

Se incubaron muestras por triplicado de 500 µL de metanauplios en tubos Eppendorf con 40 µL de levadura marcada, durante los siguientes tiempos: 5, 15, 20, 35, 45 y 50 minutos por triplicado.

Se tomó una alícuota de 30 µL (alimento vivo + levadura) que fue depositada en un porta objeto para observación en microscopia de fluorescencia.

Integridad la levadura en el tracto digestivo de rotíferos y metanauplios de Artemia

Una vez conocido el tiempo ideal de incubación, fue realizado un análisis del tracto de los rotíferos y metanauplios de *Artemia* por medio de microscopia electrónica de barrido para verificar si las levaduras se mantenían íntegras en el tracto digestivo. El protocolo de enriquecimiento siguió la misma metodología mencionada anteriormente. Una vez cosechados los rotíferos y metanauplios, éstos fueron inoculados con 1 gramo de levadura, pasado el tiempo de incubación, fueron lavados para eliminar el exceso de levaduras, se tomó

una alícuota de 2 mL que fue fijada en solución fijadora de glutaraldehído (25%) diluido en cacodilato de sodio (1:9). Una vez fijadas, las muestras fueron procesadas y observadas a través de microscopía electrónica de barrido.

Conteo de levaduras asimiladas por los metanauplios de Artemia

Adicionalmente fue realizado el conteo de levaduras incorporadas en los metanauplios para saber cuántas unidades formadoras de colonias (UFC) están presentes en los metanauplios. Para eso fue realizado el protocolo descrito anteriormente. Una vez inoculados y lavados con agua marina, fueron separados 100 metanauplios, lavados (3 veces) con amortiguador de fosfatos salino (PBS) estéril (pH 7,4) e inoculados en Eppendorf de 1,5 mL con 1 mL de PBS estéril. Luego la muestra fue macerada con pistilo estéril. Las diluciones fueron de 1:1, 1:10 y 1:100 y control (PBS estéril). Fueron inoculadas 100 μ L de cada dilución en placas de Petri con medio YPD sólido. Las placas de Petri fueron incubadas a 30° por 48 horas. Pasadas las 48 horas, fue realizado el conteo de las UFC de cada placa.

Obtención de huevos y larvicultura de *Seriola rivoliana*

Los huevos de *S. rivoliana* fueron obtenidos de la empresa Kampachi Farms. Los huevos fertilizados fueron transferidos a tanques de incubación con volumen de 100 L con suministro de aire y oxígeno puro a una densidad de huevos de 1400 huevos L^{-1} con recambio de 800%. Una vez eclosionadas, las larvas fueron transferidas a los tanques de larvicultura de 500 L cada, a una densidad de 80 larvas L^{-1} .

La temperatura de cultivo fue de 22.97 ± 0.32 °C, concentración de oxígeno disuelto de 6.79 ± 0.75 mg L^{-1} y salinidad de 37.0 ± 1.0 g L^{-1} . El fotoperiodo utilizado fue de 24 horas desde la incubación hasta el día 9; del día 9 al día 14 el fotoperiodo fue de 18 horas y del día 15 en adelante, fotoperiodo de 13 horas. El recambio de agua inició al día 5 con 20% de recambio aumentando progresivamente hasta 600% al día 30.

Las larvas fueron alimentadas del día 2 al día 18 con rotíferos (*Brachionus* sp.) enriquecidos, en sistema de agua verde con microalga viva *N. oculata* a una densidad de 0.5×10^6 . Del día 12 al 15 se proporcionaron nauplios de *Artemia* recién eclosionados y a partir del día 15, metanauplios enriquecidos con Ori-Green® (Skreting, Stavanger, Norway). A partir del día 18 se introdujo el alimento comercial Otohime (Reed Mariculture, Campbell, USA) con la siguiente composición: 56.3% proteína, 15.9% lípidos y 13.5% cenizas.

Enriquecimiento de alimento vivo

Los rotíferos fueron cosechados de sus tanques de cultivo, lavados con agua de mar filtrada y concentrados en hieleras, donde fueron enriquecidos con enriquecedor comercial Ori-green por 2 horas a la razón de $0.25 \text{ g} \times 10^6$ rotíferos, luego cosechados y lavados para la adecuada eliminación del enriquecedor. Una parte fue proporcionada al momento para las larvas y otra parte fue reacondicionada en hieleras con botellas pet rellenas de hielo para bajar la temperatura ($4\text{-}10 \text{ }^\circ\text{C}$), disminuyendo el metabolismo de los rotíferos para que éstos puedan mantener su calidad por hasta 6 horas, garantizando las posteriores alimentaciones.

Exclusivamente para el tratamiento con levadura, mitad de los rotíferos fueron enriquecidos con enriquecedor comercial y la otra mitad fue enriquecida con levadura de la siguiente manera: los rotíferos fueron cosechados del estanque de cultivo, filtrados y lavados con agua de mar filtrada, una vez limpios y concentrados en una cubeta con aireación, fue agregada levadura a la razón de $1 \text{ g} \times 10^6$ de rotíferos. Se incubaron por 15 minutos para que los rotíferos encapsularan la levadura, pasado el tiempo, los rotíferos fueron lavados, filtrados, concentrados y distribuidos a los estanques de larvicultura. El enriquecimiento con la levadura también se realizó con la *Artemia* en la misma proporción (50% emulsión comercial: 50% levadura). La incubación con metanauplios de *Artemia* fue de 45 minutos, como se ha mencionado en la sección anterior.

Resultados

Una vez observado en microscopia de fluorescencia el alimento vivo incubado en diferentes tiempos se pudo concluir que, el período de incubación más adecuado para el rotífero fue de 15 minutos y para los metanauplios de *Artemia* el período fue de 45 minutos (Fig. 4). Cabe mencionar que, a pesar de que en los períodos inferiores hubo presencia de levadura en el tracto del alimento vivo, apenas al minuto 15 y 45 en rotíferos y *Artemia*, respectivamente, fue cuando se pudo observar el tracto del alimento vivo casi completo de levadura y pasado este tiempo, se pudo observar el inicio de su deposición.

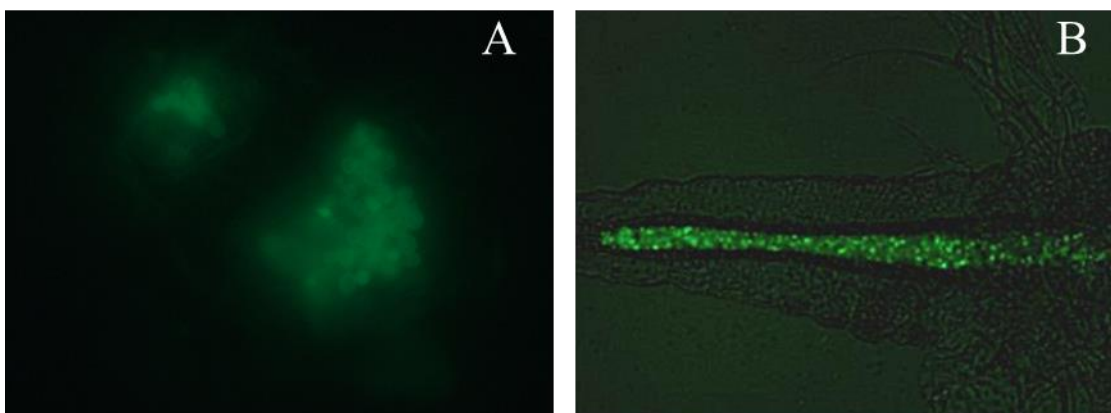


Figura 4: Incorporación de la levadura marcada con DTAF en alimento vivo. A) rotífero (15 minutos de incubación); B) metanauplio de *Artemia* (45 minutos de incubación).

La microscopía electrónica reveló que tanto los rotíferos como los metanauplios mantienen las levaduras vivas e íntegras (Fig. 5 y 6), sin que estas sean digeridas por el alimento vivo. Además, se pudo observar que la levadura también se adhiere al exterior de los rotíferos y metanauplios de *Artemia*

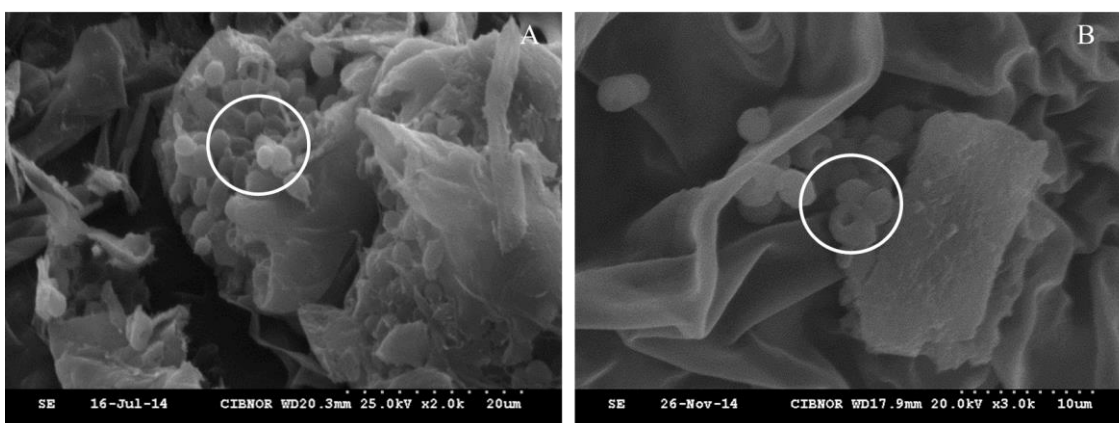


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido. Fractura de rotífero. A) Levaduras adheridas al tracto de rotífero y B) levaduras adheridas en la parte externa del rotífero.

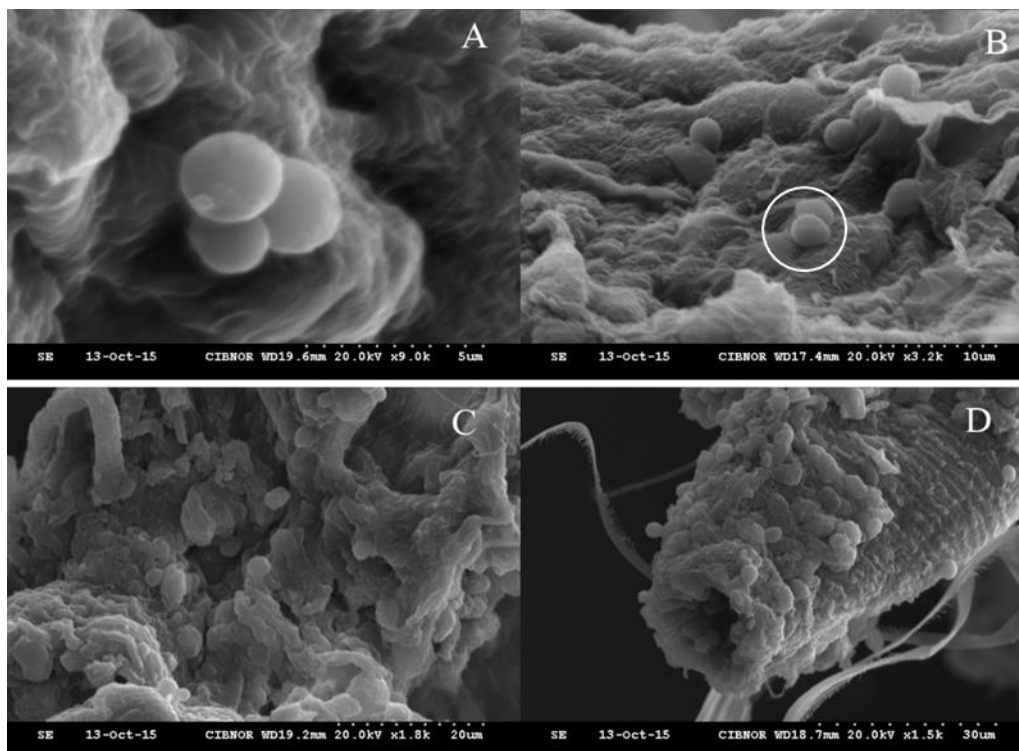


Figura 6. Microscopía electrónica de barrido. Fractura de *Artemia*. Levaduras adheridas al tracto de *Artemia* (A, B y C) y levaduras adheridas en la parte externa (D).

Para saber cuál fue la cantidad de levadura acarreada por cada metanauplio, se realizó el conteo en placas Petri con medio YPD agar. En la dilución 1:1 resultó en 9020 UFC/mL, la dilución 1:10 resultó en 1230 UFC/mL, la dilución 1:100 resultó en 130 UFC/mL, lo que nos lleva a la conclusión de que cada metanauplio de *Artemia* es capaz de acarrear aproximadamente 100 UFC de levaduras a la larva.

En el análisis de microscopía electrónica de barrido de larvas, se pudo observar la presencia de levaduras intactas en el tracto digestivo de *S. rivoliana* (Fig. 7), lo que nos indica que el alimento vivo fue capaz de llevar estas levaduras intactas al tracto digestivo de las larvas. De igual manera, las levaduras fueron recuperadas viables, mediante su cultivo en agar YPD durante 24 h, a 30°C.

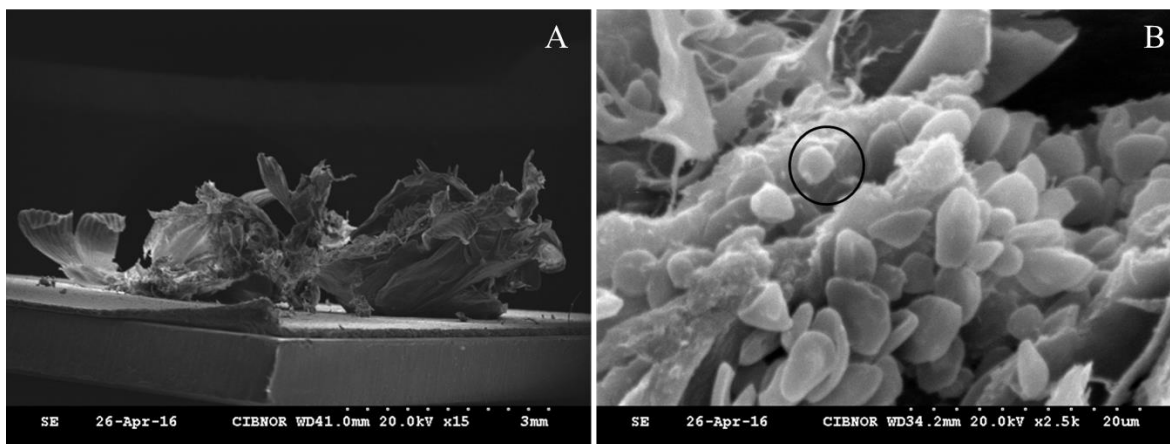


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido de larvas de *Seriola rivoliana* al 30 DDE. A) Larva fracturada; B) presencia de levadura viva en el interior de la larva.

Los resultados obtenidos en los experimentos demostraron el efecto probiótico de la levadura *D. hansenii* sobre el crecimiento, supervivencia, maduración del tracto digestivo, reducción en la incidencia de deformidades esqueléticas y cambios en la morfología del tracto digestivo de las larvas de *S. rivoliana* (datos no publicados).

Discusión

Las larvas de peces marinos generalmente no se alimentan de dieta artificial durante los primeros estadios de desarrollo y requieren de alimento vivo (Picchiatti *et al.*, 2007; Loh *et al.*, 2021), además la alimentación con alimento vivo ofrece una posibilidad de utilización como vectores que permiten que la comunidad bacteriana del hospedero sea modificada a través de la adición de probióticos (Vine *et al.*, 2006). La *Artemia* y el rotífero son adecuados para la utilización como vectores por poseer un comportamiento alimentario no selectivo y, por ser el primer alimento de larvas de peces, estos pueden transferir los beneficios del probiótico al hospedero en las primeras etapas de desarrollo. Se pudo verificar que *Artemia* y rotífero son buenos vectores de la levadura *D. hansenii*, y puede acarrear grandes cantidades de ésta al hospedero. La utilización del alimento vivo como vector de probióticos es ampliamente utilizada en la piscicultura. Gatesoupe (1994) utilizó el rotífero *B. plicatilis* como vector de BAL para verificar la resistencia de *S. maximus* contra *Vibrio* patógenas, una cepa de BAL fue cultivada e introducida diariamente para enriquecer al rotífero, a una razón de 4×10^5 UFC/mL. Una vez infectada la larva, esta tuvo supervivencia de 53% cuando

comparada a 8% del tratamiento sin probiótico. Loh *et al.* 2021 utilizaron la *Artemia* como vector de *Lactobacillus lactis* y alginato de sodio para larvas de la perca *Anabas testudineus* y obtuvieron como resultado hasta el 50% de supervivencia en los tratamientos con la *Artemia* enriquecida con el probiótico cuando comparada con el tratamiento control (20% de supervivencia), estos resultados demuestran la capacidad de la *Artemia* como vector de aditivos funcionales sin comprometimiento de la estructura y función de estos.

Carnevali *et al.* (2006) utilizaron rotíferos y *Artemia* como vectores del probiótico *L. delbrueckii* pudieron comprobar la eficiencia de estos vectores donde los tratamientos que recibieron el probiótico tenían un conteo de 4.35-5.68 log UFC/g de larva mientras que en el grupo control presentaban 0.45 log UFC/g de larva. Un punto importante que llevarse en cuenta es el período de incubación. Picchiatti *et al.* (2007) utilizaron dos cepas de bacterias ácido lácticas *L. fructivorans* y *L. plantarum*, a una concentración total de 10^5 bacteria mL^{-1} y luego incubadas por 15 minutos con el alimento vivo (rotíferos y *Artemia*). El tiempo de incubación corrobora con el presente estudio donde al incubar los rotíferos *B. rotundiformis* con *D. hansenii* observamos que 15 minutos era el tiempo adecuado una vez que pasado ese período el rotífero ya empezaba con la deposición. Dehghan *et al.* 2011 utilizaron períodos de incubación de *S. cerevisiae* en *Artemia* de 5, 10 y 24 horas. Patra *et al.* (2003) utilizaron 24 horas para enriquecer *Artemia* con *S. boulardi* y pudo observar que concentraciones superiores a 10^4 UFC mL^{-1} la supervivencia del metanauplii era muy baja debido al carácter contaminante del medio enriquecido, para mitigar el problema proporcionaron el enriquecimiento en dos raciones. Otros trabajos han utilizado diferentes tiempos de incubación del probióticos (8-48 horas) (Iranshahi *et al.*, 2012; Touraki *et al.*, 2012; Loh *et al.*, 2021). Eso demuestra la importancia de identificar y determinar el tiempo y cantidad adecuados de enriquecimiento. En el presente trabajo se pudo constatar que con tiempos más cortos se tiene una buena asimilación de la levadura por parte del alimento vivo, así mismo como Rousseau (2013), que verificó el tiempo de incubación de la levadura *D. hansenii* en *B. plicatilis* y metanauplios de *Artemia*, en el cual concluyó que para el *B. plicatilis* el tiempo ideal de incubación fue de 30 minutos. Este tiempo fue superior al tiempo observado en ese trabajo, eso debido a que 30 minutos fue el tiempo mínimo de incubación utilizado por Rousseau (2013), sin embargo, una vez pasados los 30 minutos la concentración de levaduras fue reducida de manera acentuada, mismo patrón observado en el presente trabajo. Para

Artemia obtuvo resultado satisfactorio a los 30 minutos, luego una caída de la concentración de levaduras a los 60 minutos con una recuperación de la concentración de células a las 4 horas de enriquecimiento. Este valor también difiere del presente trabajo, donde la concentración ideal fue alcanzada a los 45 minutos, seguida de deposición de la levadura. El hecho de que los tiempos de incubación de este trabajo y del trabajo de Rousseau (2013) sean diferentes, puede deberse a los intervalos aplicados para observar la incubación, donde en el presente trabajo los intervalos fueron cortos, no superior a los 15 minutos, en el trabajo de Rousseau los intervalos fueron de 30 y 60 minutos. Vázquez-Silva *et al.* (2016; 2017) incubaron metanauplios de *Artemia* con diferentes cepas de bacterias ácido lácticas para larvas de *Chirostoma humboldtianum* y *Chirostoma jordani* por un período de 40 minutos y pudieron observar mayor supervivencia, mayor crecimiento y ganancia en peso en larvas tratadas con las bacterias probióticas en relación con el control. Estos resultados comprueban que un tiempo corto de incubación es eficiente para enriquecer el alimento vivo. Cabe resaltar que un período corto de incubación facilita el manejo en el cultivo larvario.

Además del tiempo y la concentración de la levadura incubada, es necesario saber si la integridad del probiótico se mantiene una vez incorporado por el alimento vivo. Dehghan *et al.* (2011) sugieren que las células de levadura pueden ser indigeribles por los metanauplios, lo cual fue posible comprobar en el presente trabajo, ya que a través de la microscopía electrónica se pudo verificar que la levadura permanece intacta en el tracto del rotífero y *Artemia*. Dehghan *et al.* (2011) observaron que una vez que los metanauplios fueron retirados de la suspensión de levadura, hubo una rápida disminución en la cantidad de células, esta disminución puede deberse a la eliminación de la levadura después de lavar y pasar al agua de mar estéril. Los autores sugieren que la levadura detectada es la que colonizó el interior del tracto y la que se adhirió a la superficie exterior de los metanauplios, lo que corrobora con el presente estudio que identifica una gran cantidad de levaduras adheridas al exterior principalmente de los metanauplios.

Conclusiones

Se pudo concluir que los rotíferos y *Artemia* pueden actuar como vector de la levadura *D. hansenii*, capaz de transportar la levadura viva a las larvas de los peces, permitiendo la colonización del tracto digestivo desde etapas muy tempranas. Se sugiere para futuras

investigaciones, identificar la influencia de la levadura sobre la modulación de la microbiota intestinal durante la ontogenia inicial de larvas de peces marinos y su relación con la maduración del tracto digestivo e incidencia de deformidades esqueléticas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa Kampachi Farms por las facilidades en la obtención de huevos y embriones para la realización de los experimentos; a la Biol. Patricia Hinojosa Baltazar, B.M. Jorge Sandoval Soto, Dr. Marcos Quiñones Arreola, M.C. Pablo Monsalvo Spencer, Delfino Barajas, Pablo Ormart y Ariel Cruz por el apoyo técnico otorgado.

Referencias

- Andlid, T., Juárez, R.V., Gustafsson, L., 1995. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microb. Ecol.* 30, 321-24
- Angulo, C, Maldonado, M., Delgado, K., Reyes-Becerril, M. (2017) *Debaryomyces hansenii* up regulates superoxide dismutase gene expression and enhances the immune response and survival in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes after *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Dev Comp Immunol* 71, 18-27
- Angulo, M., Reyes-Becerril, M., Medina-Córdova, N., Tovar-Ramírez, D., & Angulo, C. (2020). Probiotic and nutritional effects of *Debaryomyces hansenii* on animals. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(8), 7689–7699. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10780-z>
- Balcázar, J. L., Blas, I. de, Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114(3), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- Borges, N., Keller-Costa, T., Sanches-Fernandes, G. M. M., Louvado, A., Gomes, N. C. M., & Costa, R. (2020). *Annual Review of Animal Biosciences Bacteriome Structure, Function, and Probiotics in Fish Larviculture: The Good, the Bad, and the Gaps*. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-062920>
- Breuer, U., Harms, H., 2006. *Debaryomyces hansenii*: an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* 23, 415–437.
- Burgoin, M.C. 2015. Estudio de la Incorporación de la levadura viva *Debaryomyces hansenii* a través del rotífero *Brachionus plicatilis* durante los primeros días de desarrollo del jurel *Seriola rivoliana*. Tesis (Maestría en Ciencias). La Paz, México. Programa de Posgrado del Cibnor. 87 p.
- Buzzini, P., Vaughan Martini, A. (2006) Yeast biodiversity and biotechnology. In: Rosa C, Péter G eds. *The Yeast Handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer, Berlín, pp 533-559
- Carnevali O, Maradonna F, Gioacchini G. (2017) Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture* 472:144-155. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.037>
- Carnevali, O., de Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S., Cresci, A., 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 258,430-438.
- Ceseña, C. E., Vega-Villasante, F., Aguirre-Guzman, G., Luna-González, A., & Campa-Córdova, Á. I. (2021). Update on the use of yeast in shrimp aquaculture: A minireview. *International Aquatic Research* 13, 1–16. <https://doi.org/10.22034/iar.2021.1904524.1066>
- Cross, M.L. (2002) Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34, 245-253
- Dehghan, M., Jafariyan, H., Rezai, H., Amoozagar, M. A., & Sahandi, J. (2011). Potential of Brine Shrimp (*Artemia urmiana*) Enrichment with Two Species of Bacillus and Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 3(6), 523–528.

- Donzella, S., Capusoni, C., Pellegrino, L., & Compagno, C. (2021). Bioprocesses with Reduced Ecological Footprint by Marine *Debaryomyces hansenii* Strain for Potential Applications in Circular Economy. *Journal of Fungi*, 7(12), 1028. <https://doi.org/10.3390/jof7121028>
- Donzella, S., Capusoni, C., Pellegrino, L., & Compagno, C. (2021). Bioprocesses with Reduced Ecological Footprint by Marine *Debaryomyces hansenii* Strain for Potential Applications in Circular Economy. *Journal of Fungi*, 7(12), 1028. <https://doi.org/10.3390/jof7121028>
- Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147:165
- Gatesoupe, F.J. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic Vibrio. *Aquat. Living Res.*, 7, 277–282.
- Guzmán-Villanueva, L., D. Tovar-Ramírez, R. Civera-Cerecedo. 2007. Effect of wild and ornithine decarboxylase deficient *Debaryomyces hansenii*, on *Paralabrax maculatofasciatus* larvae development. Caribbean and Latin American Aquaculture; 6–9 Noviembre; San Juan Puerto Rico.
- Hasan, K. N., & Banerjee, G. (2020). Recent studies on probiotics as beneficial mediator in aquaculture: a review. *The Journal of Basic and Applied Zoology*. <https://doi.org/10.1186/s41936-020-00190-y>
- Huyben, D., Sun, L., Moccia, R., Kiessling, A., Dicksved, J., & Lundh, T. (2018). Dietary live yeast and increased water temperature influence the gut microbiota of rainbow trout. *Journal of Applied Microbiology*, 124(6), 1377–1392. <https://doi.org/10.1111/jam.13738>
- Ishthiaq, I. B., Ahmed, J., & Ramalingam, K. (2021). Probiotics in brackish water fish farming: A special focus on encapsulated probiotics. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 11(6), 14697–14708. <https://doi.org/10.33263/BRIAC116.1469714708>
- Krogdahl, A., Sundby, A., 1999. Characteristics of pancreatic function in fish. In: Pierzynowski, S.G., Zabielski, R. Eds., *Biology of the Pancreas in Growing Animals*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 437-458
- Loh, J. Y., Chan, H. K., Yam, H. C., In, L. L. A., & Lim, C. S. Y. (2020). An overview of the immunomodulatory effects exerted by probiotics and prebiotics in grouper fish. In *Aquaculture International* 28(2), 729–750. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00491-2>
- Navarrete, P., & Tovar-Ramrez, D. (2014). Use of Yeasts as Probiotics in Fish Aquaculture. *Sustainable Aquaculture Techniques*. InTech. <https://doi.org/10.5772/57196>
- Picchietti, S., Fausto, A.M., Randelli, E., Carnevali, O., Taddei, A.R., Buonocore, F., Scapigliati, G., Abelli, L. (2009). Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T- cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shell Immunol* 26, 368–376
- Prista, C., Michán, C., Miranda, I. M., & Ramos, J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast*, 33(10), 523–533. <https://doi.org/10.1002/yea.3177>
- Reyes-Becerril, M., Angulo, C., Angulo, M., & Esteban, M. Á. (2021). Probiotic properties of *Debaryomyces hansenii* BCS004 and their immunostimulatory effect in supplemented diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Research*, 52(6), 2715–2726. <https://doi.org/10.1111/are.15123>

- Reyes-Becerril, M., M.A. Ángeles Esteban, D. Tovar-Ramírez, F. Ascencio-Valle. 2011. Polyamine determination in different strains of the yeast *Debaryomyces hansenii* by high pressure liquid chromatography. *Food Chem* 127, 1862-5
- Reyes-Becerril, M., Salinas, I., Cuesta, A., Meseguer, J., Tovar-Ramirez, D., Ascencio-Valle, F., & Esteban, M. Á. (2008). Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 25(6), 731–739. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.02.010>
- Roo, J., Fernández-Palacios, H., Hernández-Cruz, C.M., Mesa-Rodriguez, A., Schuchardt, D., Izquierdo, M., 2014. First results of spawning and larval rearing of longfin yellowtail *Seriola rivoliana* as a fast-growing candidate for European marine finfish aquaculture diversification. *Aquac Res* 45, 689–700
- Rousseau, M. 2013. Enrichment of rotifers (*Brachionus plicatilis*), *Artemia* nauplii and artificial dry feed with live yeast (*Debaryomyces hansenii*) for the growth of cultured dusky kob (*Argyrosomus japonicus*) larvae. Tesis de Maestría. Universidad de Ciudad del Cabo.
- Samat, N. A., Yusoff, F. M., Rasdi, N. W., & Karim, M. (2020). Enhancement of live food nutritional status with essential nutrients for improving aquatic animal health: A review. *Animals* 10(12) 1–27. <https://doi.org/10.3390/ani10122457>
- Schepper J.D. et al. (2017) Probiotics in Gut-Bone Signaling. In: McCabe L., Parameswaran N. (eds) Understanding the Gut-Bone Signaling Axis. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1033. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66653-2_11
- Sen, S., & Mansell, T. J. (2020). Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. In *Fungal Genetics and Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103333>
- Teles, A., Salas-Leiva, J., Alvarez-González, C. A., Gisbert, E., Ibarra-Castro, L., Pérez-Urbiola, J. C., Tovar-Ramírez, D., 2017. Histological study of the gastrointestinal tract in longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 43(6), 1613-1628. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0397-5>
- Teles, A., Salas-Leiva, J., Alvarez-González, C. A., Tovar-Ramírez, D., 2019. Changes in digestive enzyme activities during early ontogeny of *Seriola rivoliana*. *Fish Physiol. Biochem.* 45(2), 733-742. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0598-6>
- Touraki, M., Karamanlidou, G., Karavida, P., Chrysi, K. (2012) Evaluation of the probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* bioencapsulated in *Artemia* nauplii against vibriosis. *World J Microbiol Biotechnol* 28, 2425–2433. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1052-z>
- Tovar-Ramírez, D., Mazurais, D., Gatesoupe, J.F., Quazuguel, P., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J. L. (2010). Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 300, 142-147.
- Tovar-Ramírez, D., Reyes-Becerril, M.C., Guzmán-Villanueva, L., Gleaves- López, V., Civera-Cerecedo, R., Ascencio-Valle, F., Gracia-López, V., Barbosa- Solomieu, V., Gisbert-Casas, E., Andree, K. B., Alvarez-González, C. A., Moyano-López, F.J., Ortíz-Galindo, J.L., Hinojosa-Baltazar, P., Gutiérrez-Rivera, J. N., Millán-Martínez, A. A. y Linares-Aranda, M. (2008) Probióticos en Acuicultura: Avances Recientes del

- Uso de Levaduras en Peces Marinos. 237- 257 pp. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Juan Pablo Lazo y Ma. Teresa Viana. Avances en Nutrición Acuícola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino Infante, J., Cahu, C., Gatesoupe, F. J., & Vázquez-Juárez, R. (2004). Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*, 234(1–4), 415–427. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.028>
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez- Juárez, R., Lésel R., 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 204, 113–123.
- Vargas, O., Gutiérrez, M. S., Caruffo, M., Valderrama, B., Medina, D. A., García, K., Reyes-Jara, A., Toro, M., Feijóo, C. G., & Navarrete, P. (2021). Probiotic Yeasts and *Vibrio anguillarum* Infection Modify the Microbiome of Zebrafish Larvae. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.647977>
- Vargas-Albores, F., Martínez-Córdova, L. R., Hernández-Mendoza, A., Cicala, F., Lago-Lestón, A., & Martínez-Porchas, M. (2021). Therapeutic modulation of fish gut microbiota, a feasible strategy for aquaculture? In *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737050>
- Vázquez-Silva, G., Castro-Mejía, J., Sánchez de la Concha, B., González-Vázquez, R., Mayorga-Reyes, L., Azaola-Espinosa, A. (2016) Bioencapsulation of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus johnsonii* in *Artemia franciscana* as feed for charal (*Chirostoma jordani*) larvae. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15(3), 809-818.
- Vázquez-Silva, G., Ramírez-Saad, H. C., Aguirre-Garrido, J. F., Mayorga-Reyes, L., Azaola-Espinosa, A., & Morales-Jiménez, J. (2017). Effect of bacterial probiotics bio-encapsulated into *Artemia franciscana* on weight and length of the shortfin silverside (*Chirostoma humboldtianum*), and pcr-dgge characterization of its intestinal bacterial community. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(5), 1031–1043. <https://doi.org/10.3856/vol45-issue5-fulltext-18>
- Vincent, A. T., Gauthier, J., Derome, N., & Charette, S. J. (2019). The Rise and Fall of Antibiotics in Aquaculture. *Microbial Communities in Aquaculture Ecosystem*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16190-3_1
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H. (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 404-427
- Wuertz, S., Schroeder, A., & Wanka, K. M. (2021). Probiotics in fish nutrition—long-standing household remedy or native nutraceuticals? *Water*. <https://doi.org/10.3390/w13101348>
- Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., Arshad, A., Paray, B.A., Arockiaraj, J. (2020) Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Reviews in Aquaculture* 12(3), 1903-1927.

Alimentos Funcionales y su Aplicación en Organismos Acuáticos

María del Carmen Monroy Dosta
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
Departamento El Hombre y Su Ambiente
Calzada del Hueso 1100.col Villa Quietud, Coyoacan,
04960. Ciudad de México, E-mail: monroydosta@hotmail.com

Resumen

La gran expansión que ha experimentado la acuicultura en los últimos años, también ha demandado el desarrollo de estrategias para la mejora de los procesos de alimentación, con el fin de asegurar la producción de biomasa de buena calidad, con la disminución de las enfermedades, la reducción del impacto ambiental y el costo económico para los productores. Por lo que en los últimos años se ha generado gran interés por el uso de compuestos bioactivos naturales para utilizarlos como ingredientes funcionales. Los reportes indican que estos compuestos funcionan como antioxidantes, antimicrobianos, moduladores del sistema inmune y la microbiota, propiedades que se pueden aprovechar con la finalidad de mejorar la salud de los organismos. Sobre todo, porque en la mayoría de los casos las dietas comerciales no cubren todos los requerimientos de las especies cultivadas, por lo que se requieren adicionar diferentes sustancias que mejoren su nutrición y salud dentro de los que podemos mencionar a los probióticos, prebióticos, simbióticos, extractos microalgales entre muchos otros (D'Abramo, 2018). Este trabajo muestra los avances, retos y perspectivas del uso de aditivos funcionales para la producción de peces y crustáceos de consumo humano y de ornato, que se ha desarrollado por el grupo de investigación del Laboratorio de Alimentos funcionales de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Donde se han podido adicionar a las dietas balanceadas microorganismos probióticos, extractos microalgales, vegetales y de algunas macrófitas acuáticas, para mejorar la sobrevivencia, el crecimiento, control de enfermedades y pigmentación de peces y crustáceos de importancia comercial.

Keywords: *alimentos funcionales, probióticos, Fito bióticos, simbióticos*

1.Introducción

La acuicultura es probablemente el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento y representa casi el 50% del pescado destinado a la alimentación a nivel mundial, contribuyendo significativamente a la seguridad alimentaria y la disminución de la pobreza en el mundo (FAO.2016). Sin embargo, los organismos acuáticos son susceptibles a las enfermedades infecciosas y nutricionales, que trae como consecuencia mortalidad y bajas tasas de crecimiento, de tal forma, que se demandan procedimientos estrictos y estrategias de alimentación para su correcto aprovechamiento, desde la fase de cría hasta la etapa de comercialización (Sharifuzzaman y Austin, 2017). En la actualidad, la optimización de las dietas y el control de las enfermedades son dos objetivos principales para garantizar la continua expansión de la acuicultura, sobre todo porque en la mayoría de los casos las dietas comerciales no cubren todos los requerimientos de las especies cultivadas, por lo que se requiere adicionar diferentes sustancias que mejoren su nutrición y salud (D'Abramo, 2018). Así mismo otra problemática dentro de la producción acuícola es el abuso de la aplicación de compuestos químicos y antibióticos lo que ha provocado un gran incremento en la presencia de plásmidos resistentes a dichos compuestos, contaminación de los cuerpos de agua y la restricción de las exportaciones por presencia de residuos en los tejidos de los peces, llegando a incidir en la salud humana (Del'duca *et al.*, 2013). Considerando que estando en cautiverio es difícil proveer todos los nutrientes que requieren los organismos en cultivo, es importante adicionar diferentes sustancias que mejoren su estado nutricional y obtener mayores tasas de crecimiento y reproducción. En ese sentido, en los últimos años se ha dado un cambio en el concepto básico de la nutrición animal ya que tradicionalmente una “dieta adecuada” estaba en función del aporte de proteína para cubrir sus necesidades metabólicas y satisfacer la sensación de hambre de las especies en cultivo (Cheng *et al.*, 2012), pero hoy en día se busca lograr el bienestar animal mediante el aporte de todos los requerimientos nutricionales con el uso de microorganismos y sustancias que mejoren su nutrición y salud. En años recientes se ha desarrollado una novedosa etapa en el área de las ciencias de los alimentos y de la nutrición animal, donde se ha tomado particular atención en la interacción alimentos-medicina reconocidos con la denominación de "alimentos funcionales", donde se acentúa el papel de los componentes alimenticios como nutrientes esenciales para el

mantenimiento de la vida y la salud, pero destaca también el papel de elementos no nutricionales, que contribuyen a prevenir o retardar las enfermedades (Pérez *et al.*, 2014).

2.Trabajos desarrollados en el Laboratorio de Alimentos funcionales de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco

En el Laboratorio de alimentos funcionales, se han tenido avances significativos en la obtención de bacterias probióticas aisladas del tracto digestivo de diversos organismos acuáticos (*Oreochromis niloticus*, *Onchoryncus mikys*, *Macrobrachium* sp, *Puntius conchonius*, *Puntius tetrazona*, *Ambystoma mexicanum*, entre otros) (Monroy *et al.*, 2015; Ramirez *et al.*, 2018) conformando un cepario de más de 60 especies, las cuales han sido sometidas a diversas pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* para determinar su potencial probiótico, lo cual es importante ya que en la mayoría de los estudios realizados en otras instituciones, han utilizado probióticos comerciales aislados de mamíferos o del ser humano con resultados no tan eficientes como los observados con las cepas aisladas de los organismos acuáticos (Ponce *et al.*, 2016). Dentro de los parámetros evaluados en los peces, crustáceos y anfibios están: la sobrevivencia, el crecimiento, el incremento de la actividad enzimática digestiva, la composición de la microbiota intestinal mediante secuenciación masiva (Orozco *et al.*, 2015; Monroy, 2017; Cienfuegos *et al.*, 2018)

También se han utilizado las cepas aisladas para el control de diversas enfermedades infecciosas en los peces. Sin embargo, hay muchos otros aspectos que evaluar, como es el caso de la respuesta inmune. Por ello, en los últimos meses se está llevando a cabo el análisis del incremento de la actividad inmunológica mediante el conteo de linfocitos, macrófagos y células granulares eosinofílicas, así como algunas moléculas inmunológicas como la proteína C reactiva, la lisozima y se está iniciando una tesis doctoral para evaluar el efecto de bacterias probióticas sobre la expresión de los genes (*trf*, *il-1b*, *fnt α*) relacionados con la respuesta inmune innata (Ray *et al.*, 2012).

Es importante mencionar que, dentro de los alimentos funcionales, el proyecto se ha centrado más en el estudio de probióticos, por el tiempo y esfuerzo que han requerido. Pero hemos podido evaluar diferentes fuentes prebióticas como la inulina de agave, la *Moringa oleorifera* y el acetato, para estimular el crecimiento de uno o más tipos de bacterias benéficas intestinales en los peces y crustáceos (Orozco *et al.*, 2017) si bien se ha observado que si son

una fuente de carbono ideal para las bacterias, cuando se administra en la dietas de los peces, en la mayoría de los casos los resultados no han sido del todo satisfactorios, consideramos que esto se debe a que se han utilizado fuentes vegetales utilizadas en el consumo humano, pero que en los peces puede dañar su fisiología digestiva al no contar con las enzimas para aprovecharlas, por lo que se requiere realizar más estudios para evaluar otras fuentes prebióticas más cercanas a los peces y crustáceos, como las obtenidas a partir de micro y macroalgas y plantas acuáticas (Renteria *et al.*, 2020) . En este momento se está trabajando sobre el uso de la lentejilla de agua, *Lemna minor*, la microalga *Porphiridium cruentum* y el uso de hoja de almendro *Terminalia catappa* en forma de harina. Hasta el momento los resultados han sido positivos en las pruebas *in vitro*, pero falta evaluar la parte *in vivo*, es decir, en los cultivos de peces y crustáceos adicionando dichas fuentes naturales en las dietas y en combinación con bacterias probióticas para comprobar sus efectos funcionales en forma de simbióticos. Algunos de los resultados obtenidos se discutirán a continuación:

Experiencias con el uso de probióticos endógenos

Dentro de los alimentos funcionales los microorganismos probióticos son los que más se han estudiado, los cuales son definidos como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al hospedero un beneficio para su salud (FAO,2006). La principal diferencia entre la concepción de probiótico en organismos terrestres y acuáticos, es que los benéficos no solo son conferidos al hospedero, sino también al ambiente (Dalmin *et al.*, 2001; Nimrat *et al.*, 2012); debido a que la dinámica entre organismos acuáticos y su ambiente es diferente ya que comparten el mismo nicho y por tanto hay una relación directa (Spanggaard *et al.*, 2000; Ray *et al.*, 2012).

Pero para poder hablar de probióticos y sobre todo de los que han sido aislados de los propios peces y crustáceos de interés, tenemos que reconocer la microbiota intestinal permanente. Por ello el estudio de la microbiota intestinal de cualquier organismo ha tomado relevancia en los últimos años, debido a que estudios más detallados han demostrado que posee numerosas e importantes funciones como la digestión, el desarrollo de la mucosa protectora, la angiogénesis, el reconocimiento del sistema inmune y la expresión de más de 200 genes (Macfarlane, 2007). En el caso de las especies acuáticas hay una estrecha relación entre la

microbiota intestinal y la que se encuentra en el medio que le rodea; algunas de las cuales pueden permanecer de manera definitiva formando parte de la microbiota benéfica. Sin embargo, se ven afectadas por diversos factores ambientales (temperatura, concentración de oxígeno, salinidad, calidad y cantidad de alimento), así como de contaminantes químicos o antibióticos, los cuales pueden dañarla y permitir que organismos patógenos ingresen y se muestren virulentos causando procesos infecciosos en los peces y crustáceos. Conocer la microbiota benéfica permanente es fundamental para obtener probióticos específicos y que puedan ser adicionados en la alimentación de los peces (Monroy y Ramírez, 2020).

Dentro de los restudios realizados podemos mencionar el de Monroy *et al.* (2016), quienes identificaron la microbiota que se encuentra en el tracto intestinal de *Chirosoma jordani*, *Chirostoma humboldtianum* y *Chirostoma estor* con la idea de reconocer aquellas que tuvieran capacidad probiótica y se pudieran utilizar como probióticos en el cultivo de peces del género *Chirostoma*. La identificación se llevó a cabo mediante la secuenciación del gen 16S del ARNr. A las cepas identificadas se les procedió a realizar los ensayos para determinar su capacidad probiótica a través de su crecimiento en pH ácido, crecimiento en sales biliares, inhibición de los patógenos *Aeromonas hydrophila* y *Vibrio fluvialis in vitro* y crecimiento frente a antibióticos según lo estipulado por la FAO (2006) y de acuerdo con los resultados evidenciaron que el tracto digestivo de peces del género *Chirostoma* analizados en esta investigación, se encuentra dominado por los filos Protobacteria, Actinobacteria y Firmicutes, identificándose 60 cepas de las cuales el 40 % corresponden al tracto intestinal de *C. jordani*, el 30% a *C. humboldtianum*, mientras que *C. estor* solo aportó el 20% de las cepas. Las tres especies analizadas comparten algunos grupos bacterianos aun cuando se cultivan en condiciones ambientales diferentes. La microbiota común entre ellos, está conformada por cepas de las especies *Lactobacillus* sp, *L. crispatus*, *Bacillus subtilis*, *B. sp*, *Aeromonas hydrophila*, *A. hydrophila caviae*, *Vibrio fluvialis* y *Pseudomonas luteola*. Las únicas especies bacterianas que resistieron las pruebas de estrés corresponden al Género *Bacillus* representadas por *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp*, *Bacillus laterodporus*, por lo que son buenos candidatos probióticos para el cultivo del género *Chirostoma*. En otro estudio realizado por Orozco en el 2017, donde identificó la microbiota de *Carasius auratus*, se pudo observar que hay variaciones con las bacterias dominantes en comparación con el estudio anterior, ya que para *C. auratus* las especies dominantes fueron: *Bacillus*

methylophilus, *Vibrio* sp. *Vagococcus* sp, *Bacillus cereus*, *Brevibacillus agri*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas stutzeri*, *Shewanella xiamensis* *Enterococcus* sp. *Enterococcus eurekaensis*, *Paenibacillus lactis*, *Bacillus* sp, *Morganella morganii*. Para este caso solo *Pseudomonas stutzeri*, *Shewanella xiamensis* y *Morganella morganii* cumplieron con las características para ser considerados como probióticos.

Para el Caso de la Trucha arcoíris, Ramirez *et al.*, (2017) identificaron como parte de la microbiota benéfica con características probióticas a las bacterias *B. pumilus*, *S. xiamensis*, *Bacillus* sp. *B. methylophilus* y *Rhodococcus* sp. Como podemos observar en los casos anteriores, la microbiota benéfica intestinal varía entre las especies, dependiendo sus hábitos alimenticios, el tipo de cultivo y los factores ambientales, esto permite reconocer la necesidad de buscar probióticos específicos para brindar un mejor resultado (Monroy *et al.*, 2016).

Estudios con relación a la aplicación de probióticos endógenos

Los probióticos proveen de diversos beneficios a las especies cultivadas a través de diversos mecanismos de acción, por ejemplo, al producir compuestos antimicrobianos y enzimas digestivas mejoran la nutrición de los peces, facilitan la conversión de alimento, refuerzan el sistema inmune e incrementan la tolerancia a las enfermedades (Sharifuzzaman y Austin, 2017). En ese sentido, los estudios sobre fisiología digestiva han resultado de gran utilidad, ya que los peces en cultivo toman componentes de la dieta y los utilizan para formar moléculas para la construcción de tejido o bien son usadas como combustible para el desarrollo de las distintas actividades como movimiento, reproducción, competencia, defensa entre otras.

Tal es el caso del estudio de Guardiola *et al.* (2016) quienes efectuaron el control biológico de *Aeromonas salmonicida* en *Puntius Conchoniis* en condiciones de laboratorio y granja. En los cuales realizaron pruebas desafío con el patógeno y los probióticos *Citrobacter* sp, *Exiguobacterium* sp. y *Enterobacter* sp a una concentración de 10^7 ufc/ML, la primera fase en laboratorio y la segunda en granja productora de peces de ornato. Trabajo relevante ya que la mayoría de los estudios de laboratorio no reflejan las condiciones ambientales y de manejo de las granjas, dado que en condiciones de laboratorio no se produjo el proceso infeccioso al inocular el patógeno. Debido a que en condiciones de laboratorio los parámetros ambientales son controlados y no se cumple con la triada ecológica de un proceso infeccioso la cual indica

que los animales deben estar susceptibles, el patógeno debe ser virulento y debe haber condiciones favorables para este, pero en condiciones de granja el proceso infeccioso se desarrolló en las primeras 24 horas en las que se suministró *A. salmonicida* a través de *Artemia*, al observarse heridas en la piel, petequias, nado errático, exoftalmia, características de la septicemia hemorrágica. lo cual se ve atribuido a las variaciones ambientales y el estrés por el manejo.

En los tratamientos donde se adicionó *Citrobacter* sp, *Exiguobacterium* sp. y *Enterobacter* sp. junto con el patógeno, tuvieron una supervivencia del 100, 88 y 44% respectivamente, mientras que en el tratamiento control la mortalidad fue del 100%. Lo que implica que las bacterias probióticas lograron eliminar el proceso infeccioso al excluir a *A. salmonicida*. Tal como se muestra en la figura 1.

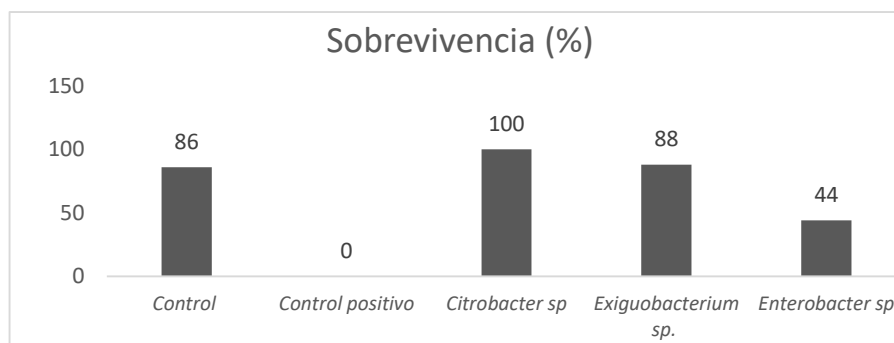


Figura 1.-Porcentaje de supervivencia de los peces durante la prueba desafío en granja. El control fue tratamiento que solo se alimentó con *Artemia* sin probiótico y sin patógeno. El control positivo solo se alimentó con *Artemia* y la bacteria patógena.

Otra de las experiencias interesantes obtenidas por el grupo de investigación, es que durante todo este tiempo que hemos caracterizado bacterias probióticas, hemos encontrado algunas cepas que además de ser probióticas tienen potencial Biotecnológico, como es el caso de la bacteria *Rhodococcus* sp la cual produce pigmentos carotenoides que pueden ser utilizados de manera exitosa en la acuicultura enfocada a la producción de especies ornamentales, ya que la coloración es uno de los puntos primordiales para su comercialización, sobre todo si se considera que los peces son incapaces de sintetizar carotenoides de novo, por lo que requieren ser adicionados en la dieta o estar presentes en el sistema de cultivo (Rajinder y Tarang, 2017). Así mismo es importante resaltar que los pigmentos carotenoides tienen una

importancia fisiológica en los peces, que implican propiedades antioxidantes, precursores de hormonas, promotores de crecimiento y mejoras en la sobrevivencia larvaria (Meyers, 2000).

En ese sentido podemos citar el trabajo de Ponce *et al.*(2016), en el cual se evaluó el efecto de la bacteria *Rhodococcus sp.* en el crecimiento, sobrevivencia y coloración de *Puntius conchoni*, a un lote de 300 larvas de siete días después de la eclosión que fueron divididas en seis acuarios de 60 litros (50 org/acuario) y alimentados con nauplios de *Artemia franciscana* enriquecida con *Rhodococcus sp.* a una concentración de 1×10^7 ce/mL También se contó con un tratamiento control donde las larvas solo se alimentaron con nauplios de *Artemia* sin probiótico. Cada quince días se obtuvieron los parámetros biométricos como peso, longitud total, alto y ancho. Al mismo tiempo se midieron parámetros fisicoquímicos como pH, oxígeno disuelto, nitratos, nitritos y amonio y se evaluó el incremento de la coloración de los peces siguiendo el método para la extracción de pigmentos descrito por Olson (1979) y citado en Narayan *et al.* (2008). El periodo de alimentación se llevó a cabo durante 60 días. La sobrevivencia, fue del 100% en ambos tratamientos, pero para el caso del crecimiento se observaron mejores resultados en longitud total, ancho y peso en los peces alimentados con *Rhodococcus* en comparación con el control (Tabla1). Con respecto a la coloración de los peces, el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($P=0.035$) observándose mejor coloración en el tejido de los peces al utilizar el probiótico, demostrando que este género presenta enormes beneficios, ya que no solo mejora los parámetros productivos, sino que también incrementa la coloración de los peces.

Tabla 1. Valores promedio del crecimiento (peso, longitud, altura y ancho) de *Puntius conchoni*

Mediciones	Control				<i>Rhodococcus</i>			
	Peso (g)	Longitud (mm)	Alto (mm)	Ancho (mm)	Peso (g)	Longitud (mm)	Alto (mm)	Ancho (mm)
1	0.24 ± 0.027	22.52 ± 1.277	6.60 ± 0.555	3.01 ± 0.146	0.33 ± 0.073	25.84 ± 1.419	7.98 ± 0.702	3.88 ± 0.197
2	0.74 ± 0.249	27.58 ± 2.149	7.55 ± 1.075	2.51 ± 0.218	0.99 ± 0.712	32.11 ± 1.083	10.63 ± 0.302	4.49 ± 0.137
3	0.49 ± 0.071	32.61 ± 0.444	10.93 ± 0.445	4.98 ± 0.096	1.18 ± 0.110	34.37 ± 1.637	11.60 ± 0.242	5.58 ± 0.369
4	0.69 ± 0.038	33.09 ± 1.471	12.71 ± 0.278	4.21 ± 0.142	1.09 ± 0.002	38.42 ± 0.987	13.12 ± 0.200	5.02 ± 0.330
Ganancia obtenida	0.006	2.81	4.59	0.002	0.072	8.07	1.14	1.03



Rhodococcus Control
Figura 3. Diferencia de coloración de los peces entre tratamientos



Figura 4. *Rhodococcus* sp en placa.

Tabla 3. Densidad óptica y contenido de carotenoides en ambos tratamientos

Tratamientos	Densidad óptica (500 nm)	Contenido de carotenoides
<i>Rhodococcus</i> sp	0.085	3.4
<i>Rhodococcus</i> sp	0.175	7.04
<i>Rhodococcus</i> sp	0.156	6.24
Control	0.051	2.04
Control	0.052	2.08
Control	0.53	2.12

Uso de extractos algales como aditivos funcionales en la acuicultura

La alimentación de especies acuícolas en el futuro va orientada a tres aspectos: mayor utilización de proteínas vegetales y derivados de proteínas animales; menor excreción de nutrientes en las aguas y mínimo riesgo para la salud humana. Las múltiples posibilidades de elaboración de alimentos funcionales basados en la incorporación de ingredientes con actividad biológica en alimentos convencionales permiten el desarrollo de una gama de productos que pueden ser utilizados (FECYT,2005). Sin embargo, la elección de dichos aditivos es importante, para buscar aquellos compuestos obtenidos de ambientes cercanos a las especies de interés con el fin de minimizar los efectos negativos. En el caso de los extractos algales podemos encontrar las microalgas como *Spirulina*, *Chlorella* y *Dunaliella*, las cuales se pueden producir a través de tecnologías de bajo costo y se comercializan como

polvos secos, pastillas y en forma líquida; así mismo las macroalgas de los géneros *Laminaria*, *Undaria*, *Durvillea* y *Ascophyllum*, que se utilizan como fuente de yodo, aluminio y hierro adicionados al alimento balanceado (Hussein *et al.*, 2019) y han mostrado su capacidad de funcionar como antioxidante además de interactuar en la fosforilación de proteínas, quelación de hierro e interferir con diversas reacciones enzimáticas, siendo la más relevante su función como antioxidantes.

En nuestra experiencia hemos optado por el uso de extractos de *Lemna Minor* para especies dulceacuícolas como la tilapia, y algunos peces ornamentales (Rentería *et al.*, 2020). También la inclusión de extractos acuosos de las hojas de *Terminalia catapa* en peces ornamentales, donde hemos observado resultados positivos, en la sobrevivencia, crecimiento, control de patógenos e incremento de pigmentos para el caso de *T. catapa*.

Uso de alimentos funcionales como inmunoestimulante

Por otra parte, los aditivos acuícolas no solo se han utilizado para mejorar la nutrición, sino que también funcionan como inmunoestimulantes. La inmunidad innata es un mecanismo de defensa sumamente importante en los peces, lo que les permite protegerse de una gran variedad de microorganismos que están inmersos en el agua que les rodea (Mohammadian *et al.*, 2016). Con el descubrimiento del ADN a finales del siglo veinte y posteriormente con los estudios sobre los mecanismos que codifican la información genética, se ha abierto la posibilidad para comprender muchos procesos de respuesta a alteraciones ambientales o aditivos en los alimentos. Dentro de las herramientas moleculares, la expresión de genes nos permite identificar los cambios transcripcionales como respuesta al uso de aditivos y nuevos componentes en las dietas (Zaha *et al.*, 2019). Por lo tanto, se convierte en una herramienta eficaz para identificar los factores claves para la supervivencia de los peces y con ello, establecer las bases para diseñar programas específicos de nutrición y control de enfermedades mediante el uso de inmunoestimulantes en acuicultura. Respecto a las diferencias entre peces y el sistema inmunitario de los mamíferos, una de las más marcadas es la ausencia de medula ósea y ganglios linfáticos, considerándose en los peces óseos al timo, riñón y bazo como análogos a la medula ósea y ganglios linfáticos en la Tabla 1 se describen las funciones de dichos órganos. Por otro lado, las investigaciones más recientes, consideran al microbioma (conjunto formado por los microorganismos en un nicho ecológico

dado), como un nuevo órgano/tejido y lo destacan por las diversas funciones relacionadas con la respuesta inmune en las que participa (Barko *et al.*, 2018).

Tabla 1 Principales órganos del sistema inmune y sus funciones (Barko *et al.*, 2018)

Órgano	Función relacionada a la inmunidad
Timo	Su principal función es la diferenciación y selección de linfocitos T.
Riñón	Contiene un gran número de macrófagos y de linfocitos B, debido a su gran capacidad hematopoyética se le considera como un análogo de la médula ósea de los mamíferos.
Bazo	Tiene funciones semejantes a las del riñón con énfasis en la presentación de antígenos y la inducción de la respuesta inmune adaptativa.
Tejido linfoide asociado a mucosas o intestino (MALT y GALT)	Se considera tejido con importantes funciones defensivas, está conformado por diferentes tipos celulares asociados a la respuesta inmune como; linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y algunos tipos de granulocitos.
Microbioma	Participa en la señalización endocrina, prevención de la colonización de microorganismos patógenos y regulación de la función inmunológica.

La respuesta innata incluye todos componentes presentes en el cuerpo antes de la aparición del agente patológico, entre estos componentes se encuentra la piel como una barrera física, el sistema de complemento, enzimas antimicrobianas, Interleucinas, el interferón y células, tales como granulocitos, monocitos, macrófagos, y células citotóxicas no específicas (NCC) (Biller y Urbinati , 2014).

Así mismo este mecanismo de defensa se caracteriza por presentar una serie de receptores de reconocimiento de patrones codificados en la línea germinal que reconocen dos tipos de patrones moleculares: los asociados a patógenos (PAMPs) como las glicoproteínas y lipopolisacáridos (LPS) de bacterias y hongos, el ADN bacteriano, el ARN viral y otras moléculas que no se encuentran normalmente en la superficie de los organismos multicelulares y por otro lado, los patrones moleculares del propio hospedador, que son el resultado del daño tisular debido a la infección o trauma, cambios necróticos o muerte celular

programada natural, pero que no se expresan normalmente en la superficie celular (Magnadóttir, 2006).

Entre los beneficios del uso de probióticos es el modular aspectos relacionados a la respuesta innata, al incrementar la expresión de genes proinflamatorios y anti-inflamatorios así como la expresión de receptores en la mucosa que disparan la respuesta inmune inespecífica, aumentan los niveles de células y proteínas relacionadas con la inmunidad inespecífica, producen sustancias antimicrobianas y presentan antagonismo frente a organismos patógenos (Gómez y Balcazar, 2008). En la tabla 2, se muestran algunas cepas empleadas en *O. niloticus* y el efecto producido en parámetros de la respuesta inmune.

Tabla 2 Algunas cepas probióticas y su efecto sobre la inmunidad de *O. niloticus*

Cepa	Fuente	Efecto	Referencia
<i>Bacillus pumilus</i>	Peces cultivados	Incremento en la actividad fagocítica y los niveles de aniones superóxido, indican una resistencia más efectiva frente a estreptococosis	Srisapoome y Areechon, 2017
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	n/e	Incrementa la actividad de lisozima y mejora en adherencia de neutrófilos , así como resistencia contra patógenos	Aly <i>et al.</i> , 2008
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Humanos	Incremento de linfocitos intraepiteliales, granulocitos acidofilicos, y aumento en la actividad del complemento y TNF α e IL-1.	Pirarat <i>et al.</i> , 2011

<i>Pediococcus acidilactici</i>	Laboratorio	Aumento en los niveles séricos de lisozima y leucocitos, efecto competitivo en intestino	Ferguson <i>et al.</i> , 2010
<i>Lactobacillus plantarum AH 78</i>	Ambiente marino	Observó una regulación significativa de la expresión de los genes de citocinas, IL-4, IL-12 e IFN- γ	Hamdam <i>et al.</i> , 2016

En la búsqueda de promover el bienestar y preservar la calidad del animal, sin comprometer al medio ambiente y la salud de los consumidores, la investigación científica se ha enfocado en la evaluación de inmunoestimulantes y antioxidantes provenientes de fuentes naturales (Bulfon y *et al.*, 2015). En este sentido, los polifenoles y flavonoides presentes en las plantas exhiben propiedades inmuno-estimulantes; estas últimas relacionadas directamente con la reducción de estrés oxidativo, el incremento de función hormonal y una mejor digestión, de tal manera que junto con los probióticos constituyen una herramienta de gran potencial para la reducción de enfermedades debido a la mejora de la respuesta inmune. Sin embargo, queda mucho por experimentar y comprender sobre el uso de aditivos, también será necesario reglamentar el uso de estos aditivos con las pruebas que permitan reconocerlos como seguros para el cultivo de peces y crustáceos, pero también para el ambiente y la salud del ser humano como consumidor final. Resaltar la necesidad de un marco regulatorio será determinante para el éxito en el sector acuícola (Monroy y Ramírez, 2020).

Literatura citada

- Balcazar, Jose & de Blas, Ignacio & Ruiz-Zarzuela, Imanol & Cunningham, David & Vendrell, Daniel & Muzquiz, José. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*. 114. 173-86. 10.1016/j.vetmic.2006.01.009.
- Barko, P., McMichael, M., Swanson, K. y Williams, D. (2018), El microbioma gastrointestinal: una revisión. *J Vet Intern Med*, 32: 9-25. <https://doi.org/10.1111/jvim.14875>.
- Biller-Takahashi JD, Urbinati EC. *Fish Immunology*.(2014) The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. *An Acad Bras Cienc*. 2014 Sep;86(3):1484-506. doi: 10.1590/0001-3765201420130159. Epub. Sep 9. PMID: 25211116.
- Bulfon, C. (2015) Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquaculture Research*, v.46, n.3, p.513-551, mar. 2015. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/are.12238/full>>. Accessed: Mar. 19, 2017. doi: 10.1111/are.12238.
- Cheng Z., Gatlin D.M. & Buentello A. (2012) Dietary supplementation of arginine and/or glutamine influences growth performance, immune responses and intestinal morphology of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Aquaculture* 362–363, 39-43.
- Cienfuegos KM, Monroy, M.C, Hamdan, AP, Castro, JM, Aguirre, JFG, Bustos, JAM. (2018). Effect of two probiotics on bacterial community composition from biofloc system and their impact on survival and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 6(2): 523–533.
- Dalmin, G & Kandasamy, Kathiresan & Purushothaman, A. (2001). Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian Journal of Experimental Biology*. 39. 939-42.
- D'Abramo, L. (2018). Fulfilling the Potential of Probiotics, Prebiotics, and Enzymes as Feed Additives for Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* Vol. 49, No. 3 June, 2018 doi: 10.1111/jwas.12528.
- Del'duca, A. Cesar, DE, Diniz, CG y Abreu, PC. (2013) Evaluation of the presence and efficiency of possible probiotic bacteria in the intestine of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent in situ hybridization technique.. *Aquaculture*. 388–391 , 115 – 12
- FAO (2006). Probióticos en los alimentos propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Roma. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Vol. 8. 83p.
- FAO. (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.
- Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología, FECYT. (2005). Alimentos funcionales. SBN/NIPO: 84-689-4204-9.313p
- Gómez GD, Balcázar JL. A. (2008). Review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunol Med Microbiol*. Mar;52(2):145-54. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x. Epub 2007 Dec 14. PMID: 18081845.

- Guardiola, Á. K. A., Monroy, D. M.C., Rodríguez, G.M. Núñez, C. M.T. (2016). Biological control of *Aeromonas salmonicida* in *Puntius Conchoniis* culture using probiotic under laboratory and fish farm conditions. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 4(4): 440-443
- Hussein R. A., Abeer A.A. Salama, M. E. El Naggar, Gamila H. A. (2019). Medicinal impact of microalgae collected from high rate algal ponds; phytochemical and pharmacological studies of microalgae and its application in medicated bandages, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 20,
- González, R. M. Monroy, D.M.C, Guzmán, G.X. Hernández, C.I., Ramos, L M.A. (2020) Antibacterial activity of *Lemna minor* extracts against *Pseudomonas fluorescens* and safety evaluation in a zebrafish model, *Saudi Journal of Biological Sciences*. Saudi Journal of Biological Sciences. Volume 27, Issue 12, 3465-3473
- MacFarlane GT, Cummings JH, Allison C. (2007) Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol* ;132:1647-1656.
- Magnadóttir B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* ;20(2):137-51. doi: 10.1016/j.fsi.2004.09.006. PMID: 15950491.
- Meyers SP, Sandersonn GW. Natural pigments for salmon feeds. *Feed Man.*, (200); 43:12-20.
- Mohammadian, T., Alishahi, M., Tabandeh, MR., Ghorbanpoor, M., Gharibi, M. (2016) Efectos probióticos de *Lactobacillus plantarum* y *L. delbrueckii* ssp. *bulguricus* sobre algunos parámetros relacionados con la inmunidad en *Barbus grypus*. *Aquac Int.* 24: 225-242.
- Monroy, D.M.C., Castro, M.J., Castro, M. G., De Lara, A. R., Ocampo, C. J.A. and Cruz, C. I. (2015) El uso de cinco cepas probióticas para la determinación de la sensibilidad (positiva o negativa) del crecimiento de bacterias patógenas (in vitro), aisladas de peces enfermos. *Revista E-Bios*, 1: 25 - 31.
- Monroy, D.M.C, Velasco, S.J, Retana, O. D. A, Peralta, M. Á. Hernández, M.M, Rodríguez, M. O. G. A, Román, R. C. (2016). Intestinal microbiota composition with probiotic potential of three species of the genus *Chirostoma*. *International Journal of Animal Science*. 5(5): 297-305
- Monroy, D. M.C y Ramírez, T. J. A. (2020). La necesidad en México de generar un marco regulatorio para el uso de aditivos probióticos en la acuicultura costera. Cap. 40. Rivera-Arriaga, E., I. Azuz-Adeath, O. D. Cervantes Rosas, A. Espinoza-Tenorio, R. Silva Casarín, A. Ortega-Rubio, A. V. Botello y B. E. Vega-Serratos (eds.), *Gobernanza y Manejo de las Costas y Mares ante la Incertidumbre. Una Guía para Tomadores de Decisiones*. Universidad Autónoma de Campeche, ricomar. 894 p.
- Narayan, S., Kass, K.E., Thoma, SEA. (2007). El tratamiento crónico con haloperidol da como resultado una disminución en la expresión de mielina / oligodendrocito-genes relacionados en el cerebro del ratón. *J. Neurosci. Res.*, 85, 757-765.
- Nimrat, S, Suksawat, S, Boonthai, T, Vuthiphandchai, V. (2012). Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary microbiology*. 159. 443-50. 10.1016/j.vetmic.2012.04.029
- Orozco, R. D. I, Monroy, D. M.C, Castro, M. J. Hamdan, P. A, Ramírez, T. A. (2017). Microbiota intestinal de peces ornamentales *Carassius auratus*. *Scientif Journal of Animal Science*(2016) 5(2) 239-245

- Pérez, Rocmira, Romeu, Belkis, Lastre, Miriam, Morales, Yeny, Cabrera, Osmir, Reyes, Laura, González, Elizabeth, Sifontes, Sergio, & Pérez, Oliver. (2014). Immunopotentiators for the Aquaculture. *Vaccimonitor*, 23(1), 24-31.
- Ponce GCV, Monroy DMC, Ramirez TJA, Ocampo CJA, Castro MJ. *Rhodococcus* sp. as probiotic bacteria for increase the survival, growth and coloration of fish *Puntius conchonus*. *Scientific Journal of Animal Science*. 2016; 5(12):370-375.
- Ramírez-T. J, Monroy, D.M.C,Hernández, H.L, Castro, M, J. Bustos,M. J, Hamdan, P. A. (2018). Presumptive probiótic isolated de *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), cultivated in México. En t. J. of Aquatic Science , 9 (1), 3-12.
- Ray, A.K. K, Ghosh , E. Ringø. (2012) Bacterias productoras de enzimas aisladas del intestino de pescado: una revisión *Acuicultura. Nutr. , 18 (2012) , págs. 465 – 492.*
- Rajinder Kaur and Tarang Kumar Shah.(2017). Role of feed additives in pigmentation of ornamental fishes. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 2017; 5(2): 684-686.
- Sharifuzzaman, Sm & Austin, Brian. (2017). Probiotics for disease control in aquaculture. *Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish*, First Edition. Edited by Brian Austin and Aweeda Newaj-Fyzul. © 2017 John Wiley & Sons Ltd.
- Spanggaard, B & Huber, I & Nielsen, J & Nielsen, T & Appel, K.F & Gram, Lone. (2000). The microflora of rainbow trout intestine: A comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture*. 182. 1-15. 10.1016/S0044-8486(99)00250-1.
- Zaha, D. C, Simona, B, Selim, A, Mirela, D, Cosmin. Tit. Mihai, V., Amarin, R. P, Pantis, C. Maghia, O. A, Bratu, O.G, Furau, C. R, Moleriu, D, Petre, I. (2019). What antibiotics for what pathogens? The sensitivity spectrum of isolated strains in an intensive care unit, *Science of The Total Environment*, Volume 687.

Flocponics: The Integration of Biofloc Technology with Plant Production And The Possibility to Reduce the Protein Level of Tilapia Juveniles' Diet

Sara Mello Pinho^{1,2}, Karel Keesman², Maria Célia Portella^{1*}

¹ São Paulo State University (Unesp), Aquaculture Center of Unesp (Caunesp), Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil. E-mail: portella@caunesp.unesp.br

² Mathematical and Statistical Methods (Biometris), Wageningen University, P.O. Box 16, 6700 AA Wageningen, The Netherlands. * Presenting author

FLOCponics is defined as the integration of biofloc-based (BFT) aquaculture with hydroponics. The technology is an alternative type of aquaponics system where recirculation aquaculture system (RAS) is replaced by a system based on BFT. The term "FLOCponics" was recently proposed to identify and unify the systems that have been previously called "BFT+hydroponics", "BFT+aquaponics" or "BFT+plant production". Aquaponics and biofloc-based aquaculture are considered environment-friendly approaches to food production, as both are intensive aquaculture systems with a strong focus on nutrient recycling and water saving. FLOCponics shares these characteristics. By adopting the principles of aquaponics and biofloc, FLOCponics can become an additional means to reduce the challenges of the global sustainable food supply. This new technology has been recently reviewed by our group of investigators which highlighted that FLOCponics is still in its initial research stage and inconsistent results were found regarding animal and plant yields in FLOCponics. Some investigations presented better or similar yield results in this system compared to traditional cultures, while others found the opposite. The further commercial application of FLOCponics requires research that provides a solid database, originating from experimental setups with characteristics similar to those of commercial production. One of the key challenges of using FLOCponics is the effective control of solids mainly in permanently coupled layouts, that may reach the hydroponic compartment and clog the plant's roots affecting the nutrients absorption. Recently, our group of investigators refined the system's design using an on-demand coupled layout and reported reduction of the critical issues related to FLOCponics systems and nutritional benefits of biofloc for tilapia production in FLOCponics. Nile tilapia juveniles fed with diets containing 24 and 28% of

crude protein (CP) grew similarly to those in RAS-based aquaponics fed with a 32% CP diet, allowing an 8% reduction in the Nile tilapia dietary CP compared to on-demand coupled aquaponics using RAS. Lettuce growth was similar in FLOCponics, RAS-based aquaponics and hydroponics. The integration of BFT with plant production fits with the circular economy concept and might contribute to social licenses and farm diversity. In terms of applicability, the FLOCponics system is likely to be applied in the short-term by farmers who already operate BFT in freshwater, adapting their structures to receive the hydroponics subsystem. For BFT production, FLOCponics seems to primarily increase the sustainable character of biofloc-based monocultures by recovering nutrients and expanding product diversity, rather than promoting higher animal growth performance.