



E.3.3.3. Informe de resultados sobre la incorporación de polisacáridos de macroalgas en piensos de acuicultura

ALGALUP - Alternativa integral para la explotación de macroalgas en la zona del Galicia y Portugal

0558_ALGALUP_6_E



ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
2.1. Experimento de alimentación de rodaballos con dietas con inclusión de macroalgas.....	5
2.1.1. Diseño experimental.....	5
2.1.2. Declaraciones éticas.....	6
2.1.3. Formulación de las dietas.....	7
2.1.4. Análisis proximal.....	8
2.1.5. Análisis enzimático intestinal.....	8
2.1.6. Análisis de actividad antiinflamatoria.....	10
2.1.7. Análisis histológico.....	11
2.1.8. Análisis estadístico.....	12
2.2. Experimento de alimentación de lubina con dietas con inclusión de macroalgas	
12	
2.2.1. Procedimiento experimental.....	12
2.2.2. Declaraciones éticas.....	13
2.2.3. Formulación de las dietas.....	13
2.2.4. Ensayo de digestibilidad.....	15
2.2.5. Muestreos.....	15
2.2.6. Análisis nutricional	16
2.2.7. Análisis de expresión genética.....	16
2.2.8. Análisis estadístico.....	18
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
3.1. Experimento rodaballo.....	18
3.1.1. Crecimiento.....	18
3.1.2. Índices de salud.....	19
3.1.3. Análisis proximal del músculo.....	20
3.1.4. Análisis enzimático intestinal.....	20
3.1.5. Análisis antiinflamatorio.....	25



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



UNIÓN EUROPEA
UNIÃO EUROPEIA



ALGALUP

· Green future ·

3.1.6.	Análisis histológico.....	27
3.2.	Experimento lubina.....	29
3.2.1.	Crecimiento.....	29
3.2.2.	Ensayo de digestibilidad.....	30
3.2.3.	Expresión génica.....	30
4.	CONCLUSIONES.....	31
5.	REFERENCIAS.....	35
	ANEXO I.....	37

1. INTRODUCCIÓN

Las propiedades de las algas son conocidas por el hombre desde hace miles de años. A nivel histórico, el mayor uso de las algas siempre ha sido el uso directo para la alimentación humana, siendo especialmente relevante en los países orientales. En otras regiones del mundo las algas han sido utilizadas como alimento de ovejas, ganado y caballos en zonas costeras, especialmente en países europeos donde existen arribazones de grandes algas pardas.

En los últimos años, con el crecimiento de la acuicultura y el interés en mejorar la salud de los peces cultivados se ha intensificado la búsqueda de productos naturales como fuente de compuestos bioactivos como los carotenoides, los polifenoles, los ácidos grasos poliinsaturados y los pigmentos con capacidad antioxidante e inmunoestimulante, entre otras características.

Las macroalgas ofrecen un ingrediente dietético novedoso y de valor añadido en las dietas formuladas para peces. Al igual que las plantas terrestres, el contenido nutricional de las macroalgas puede variar mucho entre especies, géneros, divisiones, así como entre estaciones y lugares. Además de su valor nutricional básico, las algas contienen una serie de pigmentos, compuestos defensivos y de almacenamiento, y metabolitos secundarios que podrían tener efectos beneficiosos en los peces de cultivo. Sin embargo, hasta ahora solo se ha investigado una pequeña fracción de las especies de algas como componentes potenciales en la dieta de los peces.

Hay varias formas de incluir macroalgas en las dietas para peces. Las más comunes consisten en la utilización de algas enteras, algas procesadas y extractos de algas. Los extractos pueden ser más ventajosos que el uso de algas enteras, ya que las algas tienen paredes celulares rígidas difíciles de digerir por los peces carnívoros y que producen una baja disponibilidad de nutrientes (Gong *et al.*, 2020). Algunos estudios han investigado la suplementación de las dietas con diferentes especies de algas y compuestos extraídos de algas en alimentos para peces, mostrando mejoras no sólo en el rendimiento del crecimiento, la conversión alimenticia, la eficiencia proteica (Emre *et al.*, 2013; Sony *et al.*, 2019) o la tasa de supervivencia (Magnoni *et al.*, 2017), sino también en la mejora de la inmunidad de los peces (Peixoto *et al.*, 2016; Reyes-Becerril *et al.*, 2013) y de la actividad antioxidante (Peixoto *et al.*, 2016), o reduciendo el estrés oxidativo (Magnoni *et al.*, 2017; Sony *et al.*, 2019).

En algunos estudios, se observó que la inclusión de macroalgas podría mejorar algunos parámetros de rendimiento del crecimiento de los peces. Este fue el caso de los alevines de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) alimentados con dietas con inclusión del 5% de *Pterocladia capillacea*, donde se observó un aumento en el peso corporal y ganancia de peso (Wassef *et al.* 2013).

Valente *et al.* (2006) demostraron que macroalgas como *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* y *Gracilaria cornea*, tienen un gran potencial como ingredientes alternativos en dietas para juveniles de lubina europea en niveles de inclusión dietética de hasta el 10% para *G. bursa-pastoris* y *U. rigida*, y hasta un nivel de inclusión del 5% para *G. cornea*, sin efectos adversos sobre el rendimiento del crecimiento y la eficiencia de utilización del alimento. Además, la suplementación de la dieta con extracto acuoso al 5% de *Gracilaria* sp. fue beneficiosa para la lubina, sin comprometer el aumento de peso ni afectar las tasas de consumo de alimento. Además, aumentó la resistencia a *Photobacterium damsela*, redujo los niveles de LPO y aumentó la actividad de GST, lo que sugiere una mayor capacidad para responder a niveles más altos de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidos durante la inflamación (Peixoto *et al.*, 2019).

En la zona de Galicia y el norte de Portugal abundan las macroalgas de los géneros *Codium* y *Osmundea*, que cada vez están teniendo más usos alimenticios y existe un interés creciente para estudiar su beneficio en otros ámbitos debido a los compuestos bioactivos que integran.

El proyecto ALGALUP apoya el crecimiento inteligente a través de una cooperación transfronteriza para el impulso de la innovación en el sector de las macroalgas y está cofinanciado por Interreg España-Portugal a través de los fondos FEDER. Este proyecto ha evaluado el efecto de 4 dietas con inclusión de macroalgas y extractos ricos en polisacáridos (*Codium* sp. y *Osmundea pinnatifida*) sobre el crecimiento, la fisiología digestiva y los parámetros inmunológicos en juveniles de rodaballo (*Scophthalmus maxima*) y de lubina (*Dicentraxus labrax*).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Experimento de alimentación de rodaballos con dietas con inclusión de macroalgas

2.1.1. Diseño experimental

En esta experiencia se emplearon 750 juveniles de rodaballo procedentes de la empresa Nueva Pescanova con un peso y longitud media (\pm DE) de $10,30 \pm 2,4$ g y $7,57 \pm 0,51$ cm. Los peces fueron repartidos en 15 tanques de 200 L con 50 peces por tanque. Durante los 60 días de cultivo, los peces fueron mantenidos en un sistema de recirculación, con una recirculación diaria del 100 % del volumen del tanque por hora y una renovación diaria del 10% del volumen total del sistema RAS. Cada tanque estaba provisto de aireación continua e inyección automática de oxígeno. Las

condiciones del agua se mantuvieron a $16 \pm 0,5$ °C, 35 ‰ de salinidad y $7,2 \pm 0,9$ mg /L de oxígeno disuelto. Los parámetros de RAS se mantuvieron estables durante todos los experimentos, para su control se evaluó diariamente el amoníaco, el nitrato y el nitrito. El fotoperíodo se ajustó con iluminación artificial a 12:12 horas luz/oscuridad. Las dietas formuladas fueron testadas por triplicado, tomando como réplica el factor tanque ($n = 3$), para ello los peces fueron alimentados 3 veces al día, siguiendo las tablas comerciales que recogen las necesidades nutricionales de esta especie.

Cada 4 semanas, 60 peces por tratamiento (20 por tanque) fueron pesados y medidos. Para la realización de este procedimiento, los individuos fueron anestesiados con 200 mg/L de 2-fenoxietanol. Una vez finalizado el experimento, los rodaballos fueron eutanasiados. Para ello se bajó el nivel de agua de cada tanque hasta los 50 L, se añadieron 1000 ppm de 2-fenoxietanol, y se esperó el tiempo suficiente (5-10 minutos) hasta comprobar su muerte por ausencia de movimientos respiratorios (boca y opérculo). Fueron pesados, medidos y eviscerados 75 peces por tratamiento: 1) 30 peces se emplearon para la recogida de muestras de órganos (hígado, intestino y bazo) y su posterior análisis histológico, enzimático e inmunológico 2) 30 peces para el cálculo de los índices de IVH e IHS y 3) 15 peces para la recogida de muestras de intestino para la valorización de la digestibilidad de las dietas.

Posteriormente, con los datos recogidos durante el experimento se calcularon los siguientes índices:

- 1.1. Biomasa ganada: $(\text{peso final} - \text{peso inicial}) * n^{\circ} \text{ peces por tanque}$
- 1.2. Factor de condición (FC): $(\text{peso corporal} / \text{longitud}^3) * 100$
- 1.3. Tasa de crecimiento específico (SGR): $(\text{Ln peso final} - \text{Ln peso inicial}) / \text{días}$
- 1.4. Tasa de crecimiento relativo (RGR): $(\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{peso inicial}$
- 1.5. Índice de conversión (FCR): $\text{ingesta de alimento} / \text{aumento de biomasa}$
- 1.6. Índice de eficiencia proteica (PER): $\text{aumento de la biomasa} / \text{ingesta total de proteínas}$
- 1.7. Índice hepatosomático (IHS): $(\text{peso hígado} / \text{peso corporal}) * 100$
- 1.8. Índice vicerosomático (IVS): $(\text{peso vísceras} / \text{peso corporal}) * 100$

2.1.2. Declaraciones éticas

Los ensayos de crecimiento y digestibilidad fueron dirigidos por científicos acreditados y realizados de acuerdo con la Directiva de la Unión Europea (2010/63 / EU) sobre la protección de animales con fines científicos.

2.1.3. Formulación de las dietas

Se testaron 4 dietas con inclusión de macroalgas, proporcionadas por la empresa PORTOMUIÑOS® (Galicia). Dos de ellas (DC5 y DO5) incorporaban respectivamente un 5 % de

Codium spp. y un 5 % de *Osmundea pinnatifida* deshidratadas y molidas en forma de polvo fino. Las otras dos dietas (DC15 y DO15) contenían respectivamente un 0,15 % de polisacáridos solubles extraídos de *Codium* spp. y *O. pinnatifida*. A mayores, se utilizó una dieta control estándar para juveniles de lenguado. Todas las dietas fueron formuladas y fabricadas por SPAROS® Lda. (Portugal).

La obtención de la fracción de polisacáridos solubles de las dos especies de macroalgas se llevó a cabo en un reactor de 5L termostatzado, empleando simultáneamente dos enzimas, hemicelulasa y pectinasa, con actividad celulasa y proteasa respectivamente. Se realizó una separación del sólido-líquido para eliminar los restos no hidrolizados y se fraccionó el líquido mediante membranas de ultrafiltración (10 y 1 kDa). La macroalga *O. pinnatifida* no se fraccionó bien debido a su gran viscosidad, en cambio la fracción de polisacáridos de interés de *Codium* sp. se recuperó a través de la membrana de 10 kDa. Se trabajó con secado convectivo y atomización, presentando, el primero de ellos, un rendimiento mucho mayor que el segundo, aunque este proceso requirió una trituración posterior en molino de aspas de laboratorio para la obtención de la biomasa seca.

La composición de cada una de las dietas está detallada en la Tabla 1 y se determinó según los métodos estándar de la AOAC (1990): humedad por secado a 104 °C durante 24 h, ceniza por incineración a 550 °C, estimación de proteína cruda –CP- (N x 6,25) por el método Kjeldahl después del ácidodigestión (Kjeltec 2300 Auto Analyzer; Tecator, Höganäs, Suecia), grasa por extracción con éter de petróleo por el método Soxhlet usando el sistema Soxtec 1043 HT (Foss Tecator, Suecia), perfil de ácidos grasos usando un cromatógrafo de masa de gas, siguiendo el método basado en ISO-15304 y el contenido total de fibra mediante análisis enzimático-gravimétrico.

Tabla 1 Composición (%) detallada de cada una de las dietas. DC5-Inclusión de un 5% de *Codium*, DO5-Inclusión de un 5% de *O. pinnatifida*, DC15-Inclusión de un 0.15% de extracto de *Codium* y DO15-Inclusión de un 0.15% de extracto de *O. pinnatifida*.

Composición	DC5	DO5	DC15	DO15	CONTROL
Proteína	56	57	57	54	57
Grasa	15,15	15,3	15	14,45	15,25
Humedad	4,25	3,8	3,9	10,1	4,05
Cenizas	11,25	10,75	10,85	8,5	8,95
Hidratos de carbono	13,35	13,15	13,25	12,95	14,75



Fibra Bruta	0,95	1,65	1,45	1,35	1,28
Composición ácidos grasos					
Saturados	3,2	3,35	3,35	3,35	3,55
Monoinsaturados	4,95	5,3	4,75	4,75	5
Poliinsaturados	4,95	4,75	5	4,8	5
EPA + DHA	2,365	2,275	2,405	2,175	2,295
Omega - 3	3,43	3,26	3,445	3,165	3,335
Omega - 6	1,5	1,465	1,515	1,62	1,64
Trans	0,105	0,11	0,1	0,09	0,095

2.1.4. Análisis proximal

La composición del músculo se determinó según los métodos estándar de la AOAC (1990) descritos en el apartado 3.

La composición proximal de las dietas experimentales y el músculo de los rodaballos se analizó mediante los siguientes procedimientos según los métodos de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 2000):

- materia seca, luego de secar en estufa a 105 °C hasta peso constante;
- cenizas, por incineración en un horno de mufla a 450 °C durante 16 horas;
- proteína bruta (N x 6,25), por el método Kjeldahl, después de la digestión ácida utilizando un sistema de digestión y destilación Kjeltec (Tecator Systems; modelos 1015 y 1026, respectivamente);
- lípidos, por gravimetría tras extracción de éter de petróleo en un sistema SoxTec (Tecator Systems; unidad de extracción modelo 1043 y unidad de servicio modelo 1046)
- carbohidratos, por cálculo tras la extracción de proteínas y lípidos;
- fibra bruta, por gravimetría tras extracciones sucesivas en medio ácido, alcalino y disolvente orgánico y secado.

2.1.5. Análisis enzimático intestinal

Para la determinación de las actividades amilasa, tripsina y proteasas totales en el intestino de los rodaballos, las muestras de órgano recién extraídas de los peces se lavaron con suero fisiológico, se recogieron separadamente en crioviales y se congelaron a -20 °C. Para la realización de los análisis, las muestras de intestino fueron homogenizadas en tampón fosfato 0,1 M a pH 7.0 con una relación 1:9 m/v. Posteriormente los homogenizados fueron centrifugados 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C para evitar el calentamiento y deterioro de la muestra. Finalizado el centrifugado de sobrenadantes fueron recogidos en viales nuevos y almacenados a -



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



UNIÃO EUROPEIA
UNIÓN EUROPEA



80°C. El número de viales por muestra fue de al menos 4 para poder emplear uno en cada uno de los kits a realizar, y evitar así ciclos de congelación descongelación que pudieran afectar a la viabilidad de las muestras. Previo a la realización de cada uno de ellos las muestras fueron centrifugadas de nuevo, para obtener un sobrenadante lo más limpio posible, en una microcentrífuga a 5000 g durante 1 minuto para evitar el calentamiento excesivo de la muestra.

Amilasa

Para el estudio de la actividad de la enzima amilasa se empleó el “Amylase Activity Assay Kit” número de catálogo MAK009 de Sigma-Aldrich.

Con este ensayo se puede cuantificar la actividad de la amilasa en una gran variedad de muestras biológicas. En este kit la actividad se determina mediante un ensayo enzimático acoplado, que da como resultado un producto colorimétrico leído a 405 nm, el cual es proporcional a la cantidad de sustrato, etilideno-pNP-G7, escindido por la amilasa.

La actividad de la amilasa se muestra como nmol/min/ml (miliunidades). Una unidad de amilasa es la cantidad de amilasa que escinde etilideno-Pnp-G7 para generar 1,0 micromoles de p-nitrofenol por minuto a 25°C.

Tripsina

La tripsina es una serinproteasa pancreática que hidroliza enlaces peptídicos específicamente en el lado carboxilo de los residuos de arginina y lisina. Para medir la actividad de esta enzima se empleó el kit “Trypsin Activity Colorimetric Assay Kit” de Sigma-Aldrich MAK290-1KT. En este ensayo la tripsina escinde un sustrato para generar p-NA dando como resultado un producto coloreado detectable a 405 nm. Dado que la intensidad de color es proporcional a la cantidad de p-NA, la actividad de la tripsina se puede medir con facilidad. Este kit es capaz de cuantificar en un rango de 10-100 mU (p-NA unidad) de tripsina en una gran variedad de muestras biológicas. Este ensayo aconseja hacer pruebas con diferentes concentraciones para asegurar obtener valores que entren en el rango lineal de la recta patrón generada con los estándares del método. Por esa razón se analizaron todas las muestras sin diluir, 5 tratamientos (dietas) por tres muestras (tanques) y por triplicado en el ensayo, y 2 muestras portanque de cada uno de los 5 tratamientos por triplicado aplicando una dilución de ½ en el ensayo.

La actividad de la amilasa se puede calcular con la siguiente fórmula:

$$TA = (B / (T2 - T1) * V) * FD$$

Siendo:

- B la cantidad de p-NA calculado con la curva patrón (nmol)



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



UNIÃO EUROPEIA
UNIÓN EUROPEA



· Green future ·

- T2-T1 El tiempo total que transcurre entre la primera y la segunda medida (minutos)
- V el volumen añadido de muestra en los pocillos
- FD el factor de dilución de la muestra

Como resultado, la actividad se expresa en $\text{nmols}/\text{min}/\text{mL} = \text{mU}/\text{mL}$. Definiendo una unidad como la cantidad de tripsina que escinde el sustrato produciendo $1,0 \mu\text{mol}$ de p-NA por minuto a 25°C .

Proteasas totales

Para cuantificar la actividad enzimática de las proteasas presentes en las muestras fue empleado el kit de "Pierce Protease Assay kit" de Thermo Scientific. El método de ensayo emplea caseína succinilada y ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBSA). En presencia de proteasas, la caseína succinilada se escinde en los enlaces peptídicos, exponiendo así aminas primarias. El TNBSA reacciona con estas aminas para producir un producto coloreado cuya intensidad se mide a 450 nm . El aumento de color en relación con la muestra sin tratar, es una medida de la actividad proteasa presente en la muestra.

2.1.6. Análisis de actividad antiinflamatoria

Finalizado el experimento de validación de las dietas, 10 individuos por tanque fueron eviscerados, se seleccionaron bazo e hígado para confeccionar un pool por cada órgano. Los pools por cada tanque y órgano fueron conservados en seco congelados a -20°C para posteriormente valorar una posible inflamación valorando la cantidad de IL-6 y TNF- α presente en las muestras.

Por un error el día de recogida de las muestras los peces del tanque 15 tuvieron que ser descartados. Por lo que para el estudio de inflamación únicamente se contó con 14 muestras para cada uno de los dos órganos recogidos.

Ambos kits Elisa empleados para la determinación de IL-6 y TNF- α son válidos para el estudio en tejidos homogenizados, pero únicamente el kit de IL-6 especificaba el modo de preparación de los homogenizados, al tener que emplear la misma muestra para el estudio de ambos marcadores los homogenizados para los ensayos se prepararon del siguiente modo: 100 mg de tejido fueron pesados en tubos eppendorf y homogenizados en 1 ml de PBS 1X. Los homogenizados fueron congelados a -20°C durante toda una noche y posteriormente se sometieron a dos ciclos de congelación –descongelación. Finalizado el segundo ciclo, las muestras se centrifugaron 5 minutos a $5000 \times g$. Los sobrenadantes fueron guardados en alícuotas en viales nuevos, para ser congelados -20°C hasta el momento de su análisis. Previo al análisis de cada uno de los ensayos las muestras se volvieron a someter a una centrifugación de 5 min a $5000 \times g$.

IL-6



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



UNIÃO EUROPEIA
UNIÃO EUROPEIA



Para la determinación del marcador de inflamación IL-6 se empleó el kit Elisa de CUSABIO FISH INTERLEUKIN G (IL-6) ELISA Kit, con número de catálogo CSB-E13258Fh. El rango de detección de este kit es de 12,5 a 200 pg/mL.

Este ensayo emplea la técnica de un inmunoensayo enzimático de inhibición competitiva. La placa de microtitulación proporcionada por este kit viene recubierta con un anticuerpo específico de IL-6. Los estándares y muestras desconocidas se agregan a los pocillos y también se añade una IL-6 sintética marcada con biotina. De esta manera se forma una reacción competitiva por la unión a los anticuerpos específicos para la IL-6 del fondo del pocillo. Finalizada la incubación de la placa se determina una lectura de la densidad óptica a 450 nm.

En la lectura cuanta mayor cantidad de IL-6 presenta la muestra o estándar, menos unión marcada se va a detectar, es decir, la formación de compuesto coloreado se desarrolla en sentido opuesto a la cantidad de IL-6 presente en la muestra que se quiere analizar.

TNF- α

La determinación del marcador de inflamación TNF- α se llevó a cabo mediante el kit Elisa de CUSABIO FISH TUMOR NECROSIS FACTOR α (TNF- α) ELISA Kit, con número de catálogo CSB-E13254Fh. El rango de detección de este kit es de 125 a 5000 pg/mL.

Este ensayo emplea la técnica de un inmunoensayo enzimático de inhibición competitiva. La placa de microtitulación proporcionada por este kit viene recubierta con un anticuerpo específico de TNF- α . Los estándares y muestras desconocidas se agregan a los pocillos y también se añade TNF- α marcado. De esta manera se forma una reacción competitiva por la unión a los anticuerpos específicos para TNF- α del fondo del pocillo. Finalizada la incubación de la placa se determina una lectura de la densidad óptica a 450 nm.

En la lectura cuanta mayor cantidad de TNF- α presenta la muestra o estándar, menos unión marcada se va a detectar, es decir, la formación de compuesto coloreado se desarrolla en sentido opuesto a la cantidad de TNF- α presente en la muestra que se quiere analizar.

2.1.7. Análisis histológico

Finalizado el experimento de validación de las dietas, tras ser eutanasiados, se mantuvieron en hielo hasta su evisceración. Se extrajo una porción de hígado de 5 individuos por tanque con especial cuidado de no contaminar con otros órganos o tejidos y se lavó con suero fisiológico 0.9 %. A continuación, para su fijación se introdujeron las muestras en viales con 1 mL de formaldehído tamponado a 4 °C hasta su procesamiento histológico. Este procesamiento consistió en los siguientes pasos: 1) deshidratación en series de etanol-xileno 2) inclusión en parafina 3) corte



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



UNIÃO EUROPEIA
UNIÓN EUROPEA



de secciones de 2.5 μm con microtomo 4) desparafinado 5) hidratación y 6) tinción histoquímica básica de los cortes con Hematoxilina-Eosina.

Los cortes fueron observados mediante microscopía óptica y las imágenes obtenidas fueron analizadas con un software de análisis cuantitativo de imágenes de tejidos en patología digital (HALO v.3.4.2986.151, Indica Labs, Albuquerque, NM, USA).

2.1.8. Análisis estadístico

Se comprobaron la normalidad y homogeneidad de varianzas de los resultados obtenidos. Los datos fueron analizados mediante el programa SPSS v19 (SPSS, Chicago, IL, USA), de acuerdo con el siguiente modelo lineal general, donde se consideró el tanque como factor fijo:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Donde μ es la media de la población, α el efecto del tanque, y ϵ_{ij} el error residual. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. La diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando $P < 0,05$ y se utilizó la prueba post hoc de Holm-Sidak para realizar comparaciones por pares de medias entre grupos experimentales.

2.2. Experimento de alimentación de lubina con dietas con inclusión de macroalgas

2.2.1. Procedimiento experimental

Se obtuvieron juveniles de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) de una piscifactoría comercial (Sonrionansa, Cantabria, España) y se transportaron al Centro Interdisciplinario de Investigaciones Marinas y Ambientales (CIIMAR, Universidad de Oporto), donde se realizó el experimento. Después del transporte, los peces fueron sometidos a un período de cuarentena de 15 días durante el cual los peces fueron alimentados con una dieta comercial (45% de proteínas y 18% de lípidos, NEO GOLD BLUE, Sorgal, Ovar, Portugal). Antes de la prueba de crecimiento, los peces se aclimataron al sistema experimental durante un mes. Durante este período, los peces fueron alimentados con la dieta comercial utilizada durante el período de cuarentena. Posteriormente, se establecieron 7 grupos por triplicado (21 tanques) de 25 peces con un peso corporal medio inicial de $20,6 \pm 0,01$ g y las dietas experimentales se asignaron aleatoriamente a tanques triplicados. El ensayo se llevó a cabo en un sistema de recirculación de acuicultura equipado con 21 tanques de fibra de vidrio de 500 L de capacidad de agua, termorregulados a

22.0 ± 1.0 ° C y abastecidos con un flujo continuo de agua de mar (22.0 ± 1.0 g/L de salinidad, alrededor de 8 mg/L Oxígeno). El fotoperíodo se ajustó con iluminación artificial a 12:12 horas luz/oscuridad.

La prueba duró 8 semanas y los peces se alimentaron a mano dos veces al día, 6 días a la semana *ad libitum*. Se tomó el máximo cuidado para evitar el desperdicio de alimento y asegurar que se consumiera todo el alimento suministrado.

2.2.2. Declaraciones éticas

Los ensayos de crecimiento y digestibilidad fueron dirigidos por científicos acreditados (siguiendo las recomendaciones de la categoría C de FELASA) y realizados de acuerdo con la Directiva de la Unión Europea (2010/63 / EU) sobre la protección de animales con fines científicos.

2.2.3. Formulación de las dietas

Se formularon siete dietas isoproteicas (42% de proteína cruda) e isolipídicas (18% de lípidos crudos). Se utilizó como control una dieta a base de plantas (65% de piensos vegetales; 15% de harina de pescado), sin inclusión de algas (dieta CTR). Se formularon otras seis dietas idénticas al control, pero incluyendo 5% de *Codium* spp. y *Osmundea pinnatifida* molido (dietas CO y OS, respectivamente), 5% de *Codium* sp. y *O. pinnatifida* molido y esterilizado en autoclave (dietas COA y OSA, respectivamente) y 0,5% de extractos de polisacáridos de *Codium* sp. y *O. pinnatifida* (dietas COP y OSP, respectivamente). Se añadió óxido de cromo al 0,5% a las dietas como marcador inerte, para la estimación de la digestibilidad. Se agregaron algas y óxido de cromo a las dietas, reemplazando la harina de trigo y la α -celulosa.

Las dietas se complementaron con fosfato cálcico dibásico, metionina y taurina, para evitar deficiencias de fósforo y aminoácidos, respectivamente. Todos los ingredientes de las dietas se molieron, se homogeneizaron bien y se peletizaron en seco en una peletizadora de laboratorio (California Pellet Mill, CPM Crawfordsville, IN, EE. UU.) a través de un troquel de 2 mm. A continuación, los gránulos se secaron en un horno a 40 ° C durante 24 horas y se almacenaron a - 20 °C en bolsas herméticas hasta su uso. Los ingredientes y la composición aproximada de las dietas experimentales se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de ingredientes y análisis proximal de las dietas experimentales.

Ingredientes	Dietas
--------------	--------



(% base de peso seco)	CTR	CO	COA	COP	OS	OSA	OSP
Harina de pescado ¹	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
<i>Osmundea</i> ²	-	-	-	-	5.0	-	-
<i>Osmundea</i> autoclavado ²	-	-	-	-	-	5.0	-
<i>Codium</i> ³	-	5.0	-	-	-	-	-
<i>Codium</i> autoclavado ³	-	-	5.0	-	-	-	-
<i>Osmundea</i> extracto polisacáridos ⁴	-	-	-	-	-	-	0.5
<i>Codium</i> extracto polisacáridos ⁴	-	-	-	0.5	-	-	-
Gluten de trigo ⁵	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Gluten de maíz ⁶	9.1	9.2	9.2	9.1	8.4	8.4	9.1
Harina de colza ⁷	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Harina de soja ⁸	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Harina de girasol ⁹	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
harina de trigo ¹⁰	8.4	3.2	3.2	8.4	3.9	4.0	8.4
α-cellulose	0.5	0.5	0.5	-	0.5	0.5	-
Aceite de pescado	15.0	15.0	15.0	15.0	15.1	15.1	15.0
Mezcla de vitaminas ¹¹	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Mezcla de vminerales ¹²	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Agglutinante ¹³	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Cloruro de colina (50%) (50%)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Fosfato de calcio dibásico	0.05	0.1	0.1	0.05	0.1	0.1	0.05
Óxido de cromo	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Metionina ¹⁴	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1
Taurina ¹⁵	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Análisis proximal							
(% en peso seco)	CTR	CO	COA	COP	OS	OSA	OSP
Materia seca	97.8	97.0	97.0	97.6	97.8	97.2	98.1
Proteína cruda	41.7	41.7	42.0	42.3	41.7	42.3	42.5
Lípido crudo	17.1	17.6	17.8	17.5	17.2	17.6	16.9
Cenizas	7.6	9.6	9.7	7.2	8.8	8.6	7.7
Energía (kJ g-1)	23.2	22.9	23.1	23.5	22.8	22.8	23.7

1Harina de pescado secada al vapor a partir de restos de fileteado (atún y sardina), Portugal, Secada al vapor, SAVINOR SA/ Sorgal, S.A (Proteína bruta, PC: 62,7 % materia seca, MS; Lípido bruto, CL: 11,5 % MS; Cenizas: 22,2 % MS).

2Recolectada en la Costa Norte de Portugal/Galicia (CP: 14,5% MS; CL: 1,9% MS; Cenizas: 61,8% MS).

3Recolectado en la Costa Norte de Portugal/Galicia (CP: 25,0% MS; CL: 0,9% MS; Cenizas: 40,0% MS).

4Extracto obtenido por ANFACO.

5Sorgal, S.A. Ovar, Portugal (CP: 84,2%; CL: 2,3%).



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



UNIÃO EUROPEIA
UNIÃO EUROPEIA



- 6Sorgal, S.A. Ovar, Portugal. (PB: 67,3% MS; CL: 6,6% MS; Ceniza: 1,1% MS).
7Sorgal, S.A. Ovar, Portugal (CP: 39,9% DM; CL: 2,9% DM).
8Sorgal, S.A. Ovar, Portugal (CP: 51,3%; CF: 1,1%).
9Sorgal, S.A. Ovar, Portugal (CP: 33,0% DM; CL: 1,7% DM).
10Sorgal, S.A. Ovar, Portugal. (PB: 12,1% MS; CL: 2,5% MS; Cenizas: 1,4% MS).
11 Vitaminas (mg kg⁻¹ dieta): retinol, 18 000 (UI kg⁻¹ dieta); colecalfierol, 2000 (UI kg⁻¹ dieta); α-tocoferol, 35; bisulfato de sodio de menadiona, 10; tiamina, 15; riboflavina, 25; pantotenato de calcio, 50; ácido nicotínico, 200; piridoxina, 5; ácido fólico, 10; cianocobalamina, 0,02; biotina, 1,5; monofosfato de ascorbilo, 50; inositol, 400.
12 Minerales (mg kg⁻¹ dieta): sulfato de cobalto, 1,91; sulfato de cobre, 19,6; sulfato de hierro, 200; fluoruro de sodio, 2,21; yoduro de potasio, 0,78; óxido de magnesio, 830; óxido de manganeso, 26; selenito de sodio, 0,66; óxido de zinc, 37,5; fosfato cálcico dibásico, 5,93 (g kg⁻¹ dieta); cloruro de potasio, 1,15 (g kg⁻¹ dieta); cloruro de sodio, 0,44 (g kg⁻¹ dieta).
13 Aquacube. Agil, Reino Unido.
14 Metionina de calidad alimentaria, Sorgal, S.A. Ovar, Portugal.
15 Taurina para piensos, Sorgal, S.A. Ovar, Portugal.

2.2.4. Ensayo de digestibilidad

El ensayo de digestibilidad se llevó a cabo en un sistema de recirculación de agua equipado con 10 tanques de fibra de vidrio con 50 L de capacidad de agua diseñados según Cho *et al.* (1982), con una columna de decantación conectada a la salida de cada tanque para la recolección de heces. Los tanques se abastecieron con un flujo continuo de agua de mar (25.0 ± 1.0 g/L de salinidad, aproximadamente 8 mg/L de oxígeno) termorregulado a 22.0 ± 1.0 °C. El fotoperiodo fue de 12 h de luz/12 h de oscuridad.

Se distribuyeron aleatoriamente en cada tanque diez grupos de 10 peces con un peso corporal inicial medio (± DE) de 22,2 ± 1,6 g. Las dietas CTR, CO, COA, OS y OSA se asignaron al azar a grupos duplicados. No se evaluó la digestibilidad de las dietas COP y COA, ya que no se espera que se produzcan grandes diferencias debido a los extractos de polisacáridos de algas.

Los primeros 5 días se utilizaron para que los peces se adaptaran a las dietas experimentales y no se recogieron las heces, seguidos de un período experimental de 15 días con recogida de heces. Este esquema de alimentación/recogida de heces se repitió, para cada dieta, en 2 períodos consecutivos diferentes, para replicar los resultados. Para reducir el efecto del tanque, las dietas dentro de cada período se asignaron al azar. En general, la prueba de digestibilidad duró 20 días para cada tratamiento, con 2 repeticiones (n = 4), con una duración de 40 días en total. Durante ese período, los peces fueron alimentados *ad libitum*, dos veces al día, 5 días a la semana, y las heces se recogieron una vez al día, antes de la primera toma, recogiendo el agua y las heces dentro de la columna de sedimentación. Inmediatamente después de la recogida, las heces de cada tanque se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos y se almacenaron a -20 °C. Posteriormente, las heces se secaron a 60 °C durante un día antes de analizarlas.

2.2.5. Muestras

Los peces de cada tanque se pesaron juntos al principio y al final de la prueba, después de un día de privación de alimento. Para ello, los peces se anestesiaron ligeramente con 0,3 mL/L de éter monofenílico de etilenglicol.

Después del pesaje final, los peces continuaron alimentándose durante 3 días más para minimizar el estrés de la manipulación, se tomaron muestras de 3 peces de cada tanque 4 horas después de la primera toma y se sacrificaron con una sobredosis de anestésico. Se recogió el intestino entero, liberado de los tejidos adiposo y conectivo adyacentes. Se tomaron muestras del intestino distal para evaluación del estado inmune (DI; se distingue del intestino medio por un diámetro mayor y una mucosa más oscura). Las muestras se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se secaron cuidadosamente con papel secante, se conservaron durante la noche en ARN Later a 4 °C, y luego se almacenó a -80 °C hasta que se realizaron los análisis de expresión génica.

2.2.6. Análisis nutricional

La composición proximal de ingredientes, dietas experimentales y heces se analizó mediante los siguientes procedimientos según los métodos de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 2000): biomasa seca, después de secar en estufa a 105 °C hasta peso constante; cenizas, por incineración en una mufla a 450 °C durante 16 horas; proteína bruta (N x 6,25), por el método Kjeldahl, después de la digestión ácida utilizando un sistema de digestión y destilación Kjeltex (Tecator Systems; modelos 1015 y 1026, respectivamente); lípidos, por extracción de éter de petróleo en un sistema SoxTec (Tecator Systems; unidad de extracción modelo 1043 y unidad de servicio modelo 1046); el contenido energético bruto se determinó utilizando un calorímetro de bomba de oxígeno (Calorímetro Parr 1281, Parr Instrument Company, Moline, IL, EE. UU.). El óxido crómico en las dietas y las heces se determinó mediante digestión ácida según Furukawa y Tsukahara (1966).

2.2.7. Análisis de expresión génica

El ARN total se extrajo de las muestras DI, utilizando el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se homogeneizaron en 600 µL de reactivo TRI utilizando un homogeneizador Precellys 24 (Bertin Technologies, Montigny -Le- Bretonneux, Francia) y luego se centrifugaron a 13000 g durante 1 minuto a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se mezcló con etanol (1:1 v/v; PanReac, Barcelona, España). A continuación, la mezcla se transfirió a una columna de centrifugación (suministrada con el kit) y se centrifugó durante 1 minuto a 13 000 g, a 4 °C. A continuación, el ARN se sometió a tratamiento con ADNasa y se lavó, siguiendo las instrucciones del fabricante del kit. Finalmente, se realizó la elución de ARN usando 25 µL de agua tratada con DEPC. La calidad del ARN se evaluó

utilizando la placa μ Drop™ (Thermo Scientific, Courtaboeuf, Francia) en un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific, Courtaboeuf, Francia) y la integridad de las bandas de ARNr 28S y 18S se verificó mediante electroforesis. El producto final se mantuvo a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso posterior.

El cDNA se generó a partir de $1\text{ }\mu\text{g}$ de RNA total utilizando el kit de síntesis de cDNA First-Strand NZY (NZYTech, Lisboa, Portugal), siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación, el ADNc resultante se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

Se determinó la expresión génica de las citocinas proinflamatorias interleucina-1-beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la citocina antiinflamatoria interleucina-10 (IL-10) en el intestino, usando PCR cuantitativa a tiempo real (CFX Connect™ Real-Time System, Bio-Rad, California, EE. UU.). La amplificación de cDNA se realizó usando cebadores de PCR específicos (3).

Tabla 3. Secuencias de cebadores utilizadas para la amplificación transcripcional por RT-PCR.

Gen	Secuencia	Eficiencia	Número de registro
18S	F: AGGGTGTGGCAGACGTTAC	2.0	AM490061
	R: CTTCTGCCTGTTGAGGAACC		
IL-1 β	F: ATCTGGAGGTGGTGGACAAA	1.9	AJ311925
	R: AGGGTGCTGATGTTCAAACC		
IL-6	F: ACTCCTCGGTCTCTCCTCGTATCCGC	1.9	AM490062
	R:CTGTGTCGAGATCATCGTTGGCTTCATAAAAGTC		
TNF- α	F: CACAAGAGCGCCATTCATTACAAGGAG	2.0	DQ200910
	R: GGAAAGACGCTTGGCTGTAGATGG		
IL-10	F: ATCACAGTTCGGCGTATTT	2.0	DQ821114
	R: ATGGACACGTCAAAGGTGCC		

Para determinar la eficiencia del cebador, se prepararon siete diluciones dobles en serie de una mezcla de ADNc de todas las muestras, y se calculó la eficiencia a partir de la pendiente de la línea de regresión del ciclo de cuantificación (Ct) frente al log 10 de las diferentes diluciones de ADNc (Pfaffl, 2001). Las reacciones de qPCR a tiempo real se realizaron utilizando $3,5\text{ }\mu\text{L}$ de agua ultrapura (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania), $5\text{ }\mu\text{L}$ de supermezcla SsoAdvanced Universal SYBR® Green (Bio-Rad, California, EE. UU.), $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de cada cebador y $1\text{ }\mu\text{L}$ ADNc de cada muestra, sumando hasta un volumen de reacción final de $10\text{ }\mu\text{L}$. Las diferentes transcripciones se amplificaron utilizando triplicados técnicos por muestra, en las siguientes condiciones: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos para desnaturalización, seguido de 40 ciclos de $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 segundos y $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos. Se realizó un análisis de la curva de fusión para verificar que solo se producía una amplificación específica y que no se amplificaban los dímeros del cebador. La expresión relativa de cada transcripción se normalizó al gen de mantenimiento seleccionado (ARN

ribosómico 18S, 18S), debido a su estabilidad de expresión en el intestino y se calculó mediante el método Pfaffl (Pfaffl, 2001).

2.2.8. Análisis estadístico

Antes de los análisis, se probó la normalidad y homogeneidad de los datos mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. La unidad experimental considerada fue el tanque para el rendimiento de crecimiento ($n = 3$) y para la digestibilidad de las dietas ($n = 4$), y el pez para la expresión génica ($n = 9$). Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), con el tratamiento dietético como factor. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software IBM SPSS Statistics v25 (IBM Corp.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Experimento rodaballo

3.1.1. Crecimiento

Al final del experimento los peces tenían un peso y longitud media (\pm DE) de $26,32 \pm 5,24$ g y $11,81 \pm 7,19$ cm respectivamente. No se observó una diferencia significativa en el peso y longitud de los rodaballos entre dietas ($P > 0,05$), pero sí se encontraron diferencias en los parámetros de crecimiento SGR y RGR. La dieta DC15 mostró valores más bajos en ambas tasas, con un 1,7 y 1,35 respectivamente. Estos datos son significativamente diferentes de los de la dieta DO15 que obtuvo los valores más altos en SGR (2,02) y RGR (1,76). Los datos de crecimiento de las dietas con inclusión de macroalgas enteras y de polisacáridos extraídos no mostraron diferencias significativas con el control. Sin embargo, la tendencia ha mostrado claramente que las dietas DO5 y DO15 favorecen un incremento del SGR en 6 y 9,25 %, respectivamente frente al control y un 8 y 14% respectivamente en cuanto al RGR ().

Tabla 4 Resultados obtenidos en los índices de crecimiento calculados (SGR: tasa de crecimiento específica; RGR: tasa de crecimiento relativa; FCR: índice de conversión; PER: ratio de eficiencia de proteína) (media \pm DE; $n = 3$)

	DC5	DO5	DC15	DO15	DC
PESO INICIAL (G)	10,74 \pm 2,41	9,94 \pm 2,77	10,82 \pm 2,3	9,60 \pm 2,2	10,41 \pm 2,2
PESO FINAL (G)	27,01 \pm 5,54	26,31 \pm 4,96	25,28 \pm 4,06	26,42 \pm 5,21	26,17 \pm 6,17

SGR (%)	1,84±0,05 ^{a,b}	1,95±0,01 ^{a,b}	1,70±0,12 ^a	2,02±0,09 ^b	1,84±0,09 ^{a,b}
RGR (%)	1,51±0,07 ^{a,b}	1,65±0,01 ^{a,b}	1,35±0,15 ^a	1,76±0,12 ^b	1,51±0,12 ^{a,b}
ALIMENTO INGERIDO (G)	724,45±22	711,18±14	697,65±14	710,90±11	720,48±27
BIOMASA GANADA (G)	846,39±61	851,18±41	752,20±67	874,49±47	819,75±79
FCR (%)	0,86±0,04	0,84±0,02	0,94±0,13	0,82±0,07	0,89±0,11
PER (%)	1,79±0 ^a	1,75±0 ^a	1,75±0 ^a	1,85±0 ^b	1,75±0 ^a

Las letras en superíndice dentro de una fila representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)

Durante el experimento los peces alimentados con la dieta DC15 son los que menos han ingerido pienso y menos han ganado biomasa. Aunque no se observa una diferencia significativa, también el FCR sigue la misma tendencia con los peores datos observados en la dieta DC15. Cabe resaltar con la dieta DO15 mejora el FCR en 8,2% respecto a la dieta control (DC), y también al resto de dietas testadas.

3.1.2. Índices de salud

El análisis de los datos del índice hepatosomático mostraron que el control tiene un valor significativamente bajo respecto al resto de las dietas. En el caso del índice viscerosomático los valores más bajos han sido observados en la dieta DO15 y DC cuando los más altos en la dieta DC15 (Tabla 5).

Tabla 5 Resultados obtenidos en los índices de salud calculados (HSI: índice hepatosomático; VSI: índice viscerosomático) (media ± DE; n = 3). Las letras en superíndice dentro de una fila representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)

	DC5	DO5	DC15	DO15	DC
HSI	1,56±0,09 ^a	1,41±0,08 ^a	1,47±0,06 ^a	1,33±0,05 ^{a,b}	1,09±0,06 ^b
VSI	4,08±0,16 ^b	4,13±0,13 ^b	4,96±0,24 ^a	3,63±0,18 ^b	3,69±0,12 ^b

3.1.3. Análisis proximal del músculo

El análisis de la composición nutricional del músculo mostró ausencia de diferencias significativas en humedad, ceniza, proteína, carbohidratos y grasa (Tabla 6). Aunque, en estos últimos se observa una diferencia importante entre las medias de las diferentes dietas, con mayor porcentaje en los peces control respecto al restos alimentados con inclusión de algas. La menor cantidad de grasa se observó en los músculos de la dieta DC15.

Tabla 6. Composición nutricional del músculo de rodaballo obtenida por cada dieta testada en porcentaje (media \pm DE; n = 3) Las letras en superíndice dentro de una fila representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)

	DC5	DO5	DC15	DO15	DC
HUMEDAD	79,85 \pm 1,3	79,14 \pm 0,93	79,88 \pm 0,60	78,84 \pm 1,90	79,6 \pm 0,40
PROTEÍNA	17,5 \pm 1,73	17,93 \pm 0,81	17,73 \pm 0,67	17,9 \pm 1,77	17,9 \pm 0,36
CENIZAS	1,11 \pm 0,38	1,22 \pm 0,60	0,99 \pm 0,07	1,13 \pm 0,26	1,10 \pm 0,23
GRASA	0,81 \pm 0,28	0,91 \pm 0,22	0,68 \pm 0,16	0,83 \pm 0,14	1,19 \pm 0,16
HIDRATOS DE CARBONO	0,43 \pm 0,12	0,57 \pm 0,21	0,53 \pm 0,06	0,70 \pm 0,35	0,67 \pm 0,06
ÁCIDOS GRASOS SATURADOS	0,18 \pm 0,05 ^{ab}	0,24 \pm 0,01 ^b	0,14 \pm 0,04 ^a	0,17 \pm 0,02 ^{ab}	0,24 \pm 0,02 ^b
ÁCIDOS GRASOS MONOINSATURADOS	0,27 \pm 0,08 ^{ab}	0,27 \pm 0,08 ^{ab}	0,23 \pm 0,06 ^a	0,30 \pm 0,07 ^{ab}	0,43 \pm 0,06 ^b
ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS	0,29 \pm 0,13	0,33 \pm 0,11	0,25 \pm 0,06	0,28 \pm 0,06	0,41 \pm 0,06
TRANS	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
EPA+DHA	0,14 \pm 0,06	0,17 \pm 0,06	0,13 \pm 0,02	0,11 \pm 0,03	0,16 \pm 0,01
OMEGA 3	0,18 \pm 0,09	0,22 \pm 0,08	0,17 \pm 0,04	0,16 \pm 0,05	0,23 \pm 0,02
OMEGA 6	0,11 \pm 0,05	0,10 \pm 0,02	0,08 \pm 0,03	0,12 \pm 0,05	0,17 \pm 0,04

En cuanto al perfil de ácidos grasos, se ha observado una diferencia significativa en los saturados y monoinsaturados. Donde las mayores cantidades en ambos grupos han sido observadas en el control y las menores en los peces de la dieta DC15.

3.1.4. Análisis enzimático intestinal

Amilasa

El ensayo se realizó una primera vez con la totalidad de las muestras; en esta primera prueba se observó que las diluciones empleadas en el ensayo fueron excesivas y todos los resultados se encontraban por debajo de la curva patrón realizada (Figura 1) con los estándares del método empleado.

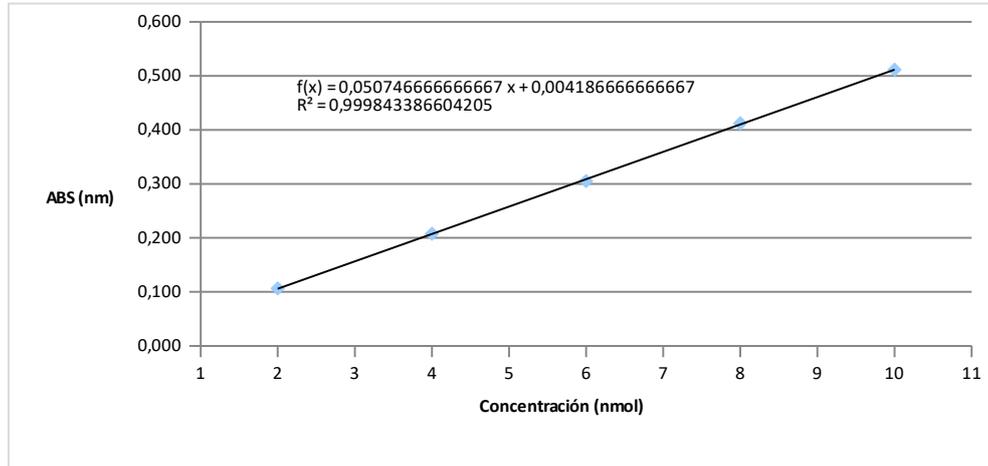


Figura 1. Recta patrón de ensayo amilasa.

El ensayo fue repetido con una dilución menor, debido al número de test disponibles en el kit una vez realizado por primera vez, no se pudo repetir en su totalidad. Se analizaron únicamente dos muestras por tratamiento y por duplicado en lugar de triplicado en el ensayo. En este caso, salvo una muestra para el tratamiento D, el resto de las muestras no entraron el rango de la curva patrón (Figura 2).

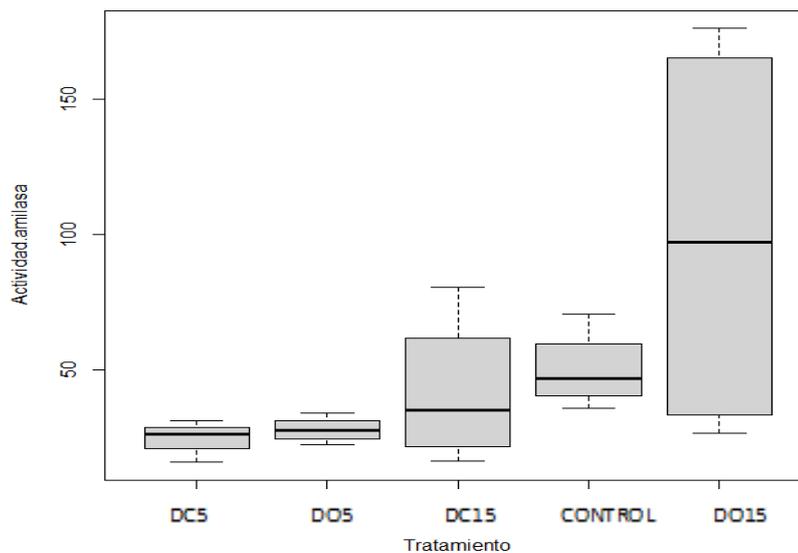


Figura 2. Actividad de la amilasa por dieta testada.



Los datos observados tienen que tomarse con bastante cautela teniendo en cuenta que la mayoría de los puntos se encuentran fuera de la línea de la recta patrón. Una posible fuente de error a la hora de analizar las muestras fue el proceso de homogenizado, es probable que la centrifugación con los medios empelados haya sido insuficiente y los sobrenadantes tuvieron restos que interfirieron de manera notable en los análisis.

Aun así, se observa que no hay diferencia significativa entre las muestras debido a la variación dentro del mismo tratamiento. En la dieta DO15, se observó unos valores de amilasa son más altos que en el resto. Por lo tanto, la dieta con una inclusión de 0.15% de extractos de *O. pinnatifida* podría tener un mayor desarrollo de la actividad digestiva.

Tripsina

Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 3 y la Figura 4; la concentración obtenida para las muestras diluidas es mayor que para las muestras sin diluir lo que nos sugiere una elevada cantidad de interferencias presentes en la muestra objeto de estudio.

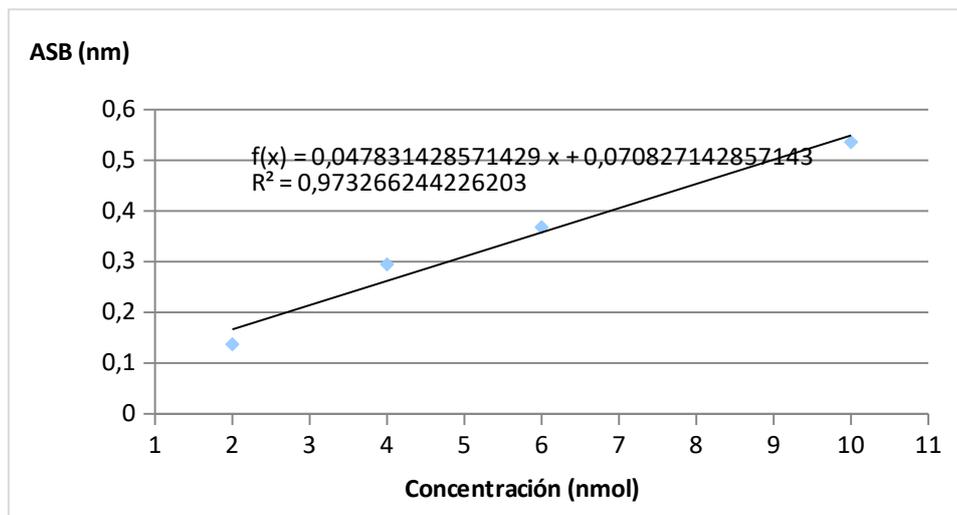


Figura 3. Recta patrón de ensayo de la tripsina.

Los datos observados no muestran una diferencia significativa en la actividad de la tripsina en el intestino. Parece que la inclusión de algas no afecta directamente la disponibilidad y expresión esta enzima.

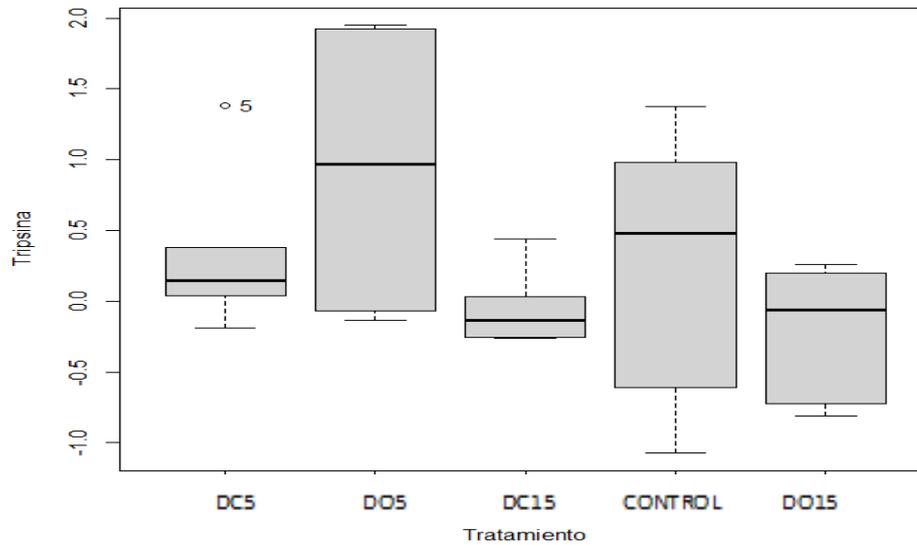


Figura 4. Actividad de la tripsina por dieta testada.

Proteasas totales

La actividad proteasa fue ensayada para la totalidad de las muestras disponibles, debido a la cantidad de muestras y las exigencias del método fue imposible trabajar con triplicados de cada una de las muestras bajo estudio. El ensayo se realizó con duplicados para cada una de las muestras.

Con la absorbancia de los estándares del método se hizo una curva estándar (Figura 5) para evaluar la actividad proteasa relativa en cada muestra desconocida. Los resultados obtenidos se pueden observar en las Figuras 5 y 6. Los resultados muestran ABS de las muestras bajo estudio con valores que entran todos en la curva estándar.

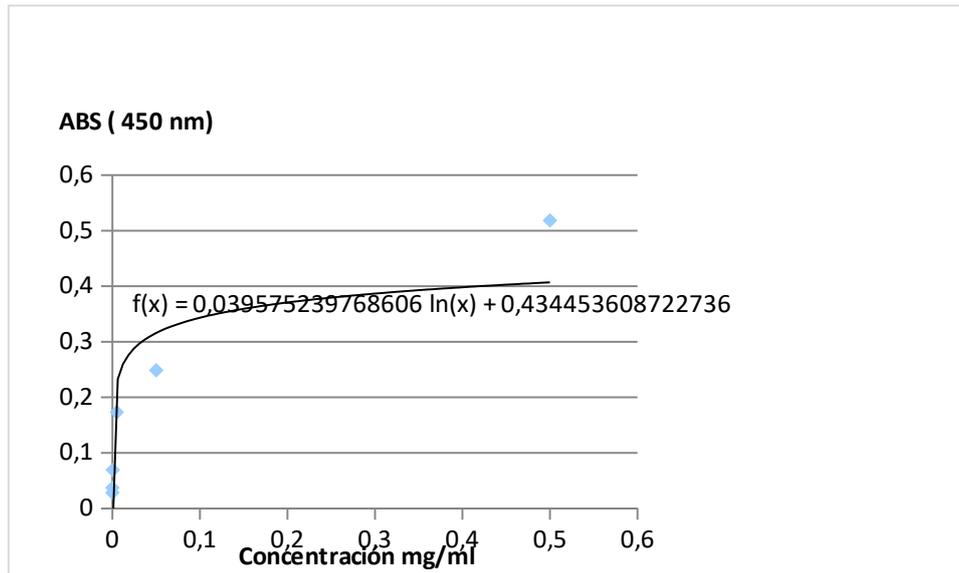


Figura 5. Recta patrón de ensayo proteasas totales.

La actividad de las proteasas totales varía entre muestras (Figura 6). Especialmente, se observó una variación importante en el caso de la dieta DO5. No se observa una diferencia significativa entre las diferentes dietas, aunque las actividades más bajas se han detectado en las dos dietas con inclusión de *Codium* sp.

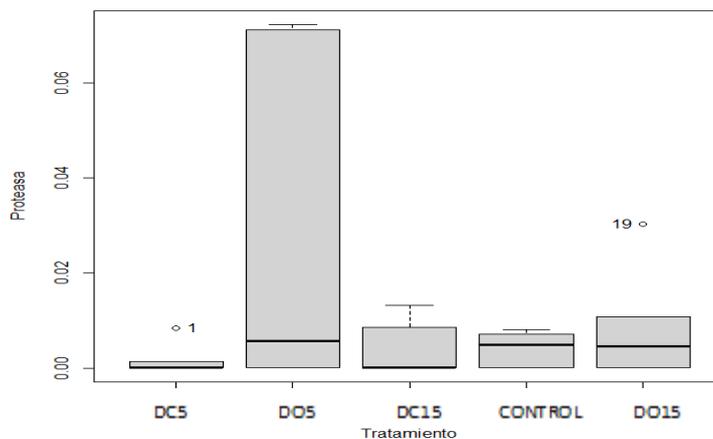


Figura 6. Resultados obtenidos de la actividad proteasa total.



3.1.5. Análisis antiinflamatorio

IL-6

En la Figura 7 se pueden observar los resultados obtenidos en la cuantificación de IL-6 presente en las muestras bajo estudio tanto en el bazo como en el hígado. En ambos casos no se observa una diferencia significativa de la actividad de la IL-6 aunque los datos de la dieta control muestran la mayor actividad en ambos casos con 85.22 y 80.09 pg/mL. Los niveles de concentración más bajos coinciden con la dieta DC15. Cabe destacar que las diferencias entre el control y el resto de las dietas es más acentuada en el bazo.

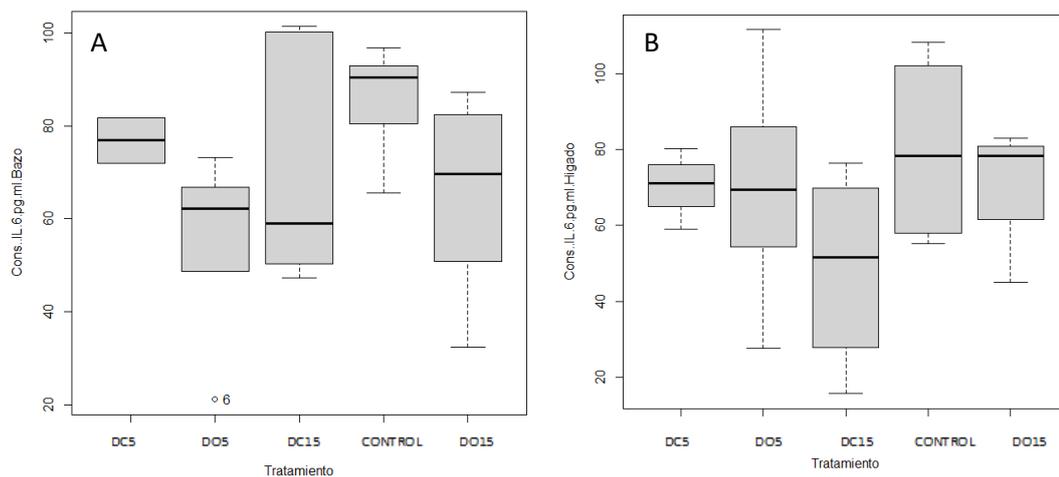


Figura 7. Resultados obtenidos en la cuantificación de IL-6 A. Bazo B. Hígado.

TNF- α

En el ensayo del TNF- α para las muestras de bazo y de hígado se obtuvieron los resultados que se observan en la Figura 8. Los valores más altos obtenidos en ambos casos corresponden a la dieta DC5 y los más bajos en la de DC15 para el bazo y la dieta control para el hígado. Aunque no se detecta una diferencia significativa entre las diferentes dietas.

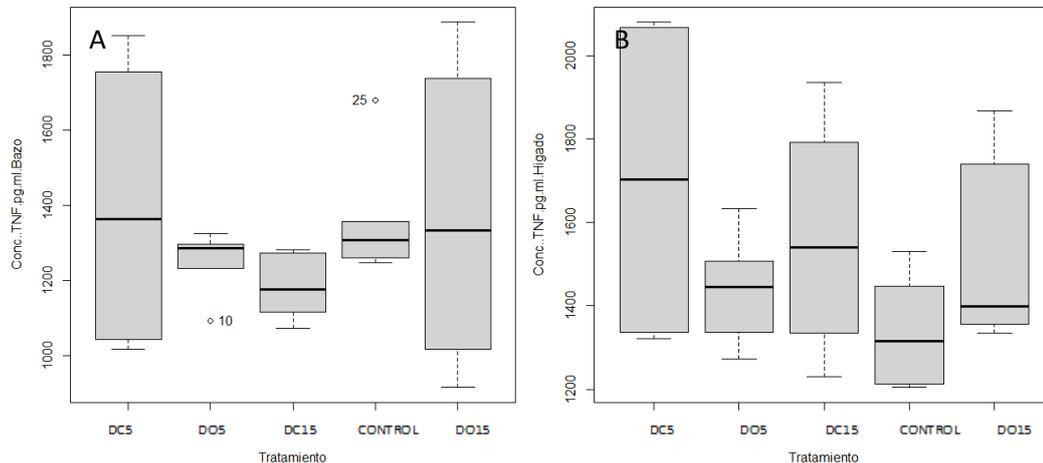


Figura 8. Resultados obtenidos en la cuantificación de TNF-ALFA A. Bazo B. Hígado.

3.1.6. Análisis histológico

El análisis histológico del sistema digestivo es un buen indicador del estado nutricional del pez, siendo el hígado uno de los órganos más importantes en la absorción de los nutrientes proporcionados en las dietas. Este análisis puede evidenciar signos de malnutrición, inanición o un efecto negativo de la dieta en la morfología de estos órganos.

Entre los cambios más comunes que se pueden apreciar en el hígado se encuentra la vacuolización y el tamaño del núcleo de los hepatocitos. Ambos parámetros analizados mediante un software de imagen, muestran los siguientes resultados:

- Vacuolización de los hepatocitos: la dieta en la que se ha detectado un mayor porcentaje de gotas lipídicas con respecto al control ha sido la dieta que incluye un 0.15% de extracto de *O. pinnatifida* en su formulación (DO15) (Figura 9; Anexo I). A diferencia de ello, las gotas lipídicas con mayor diámetro fueron observadas en la dieta con una inclusión de 5% de *Codium* sp. (DC5) (Figura 10, Anexo I).

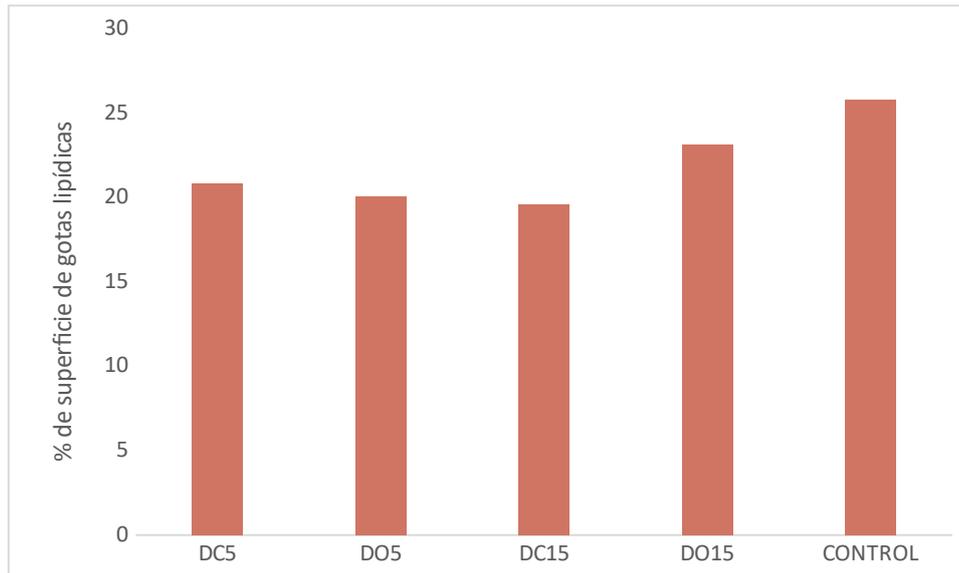


Figura 9. Porcentaje de superficie lipídica en hígado por cada dieta testada. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

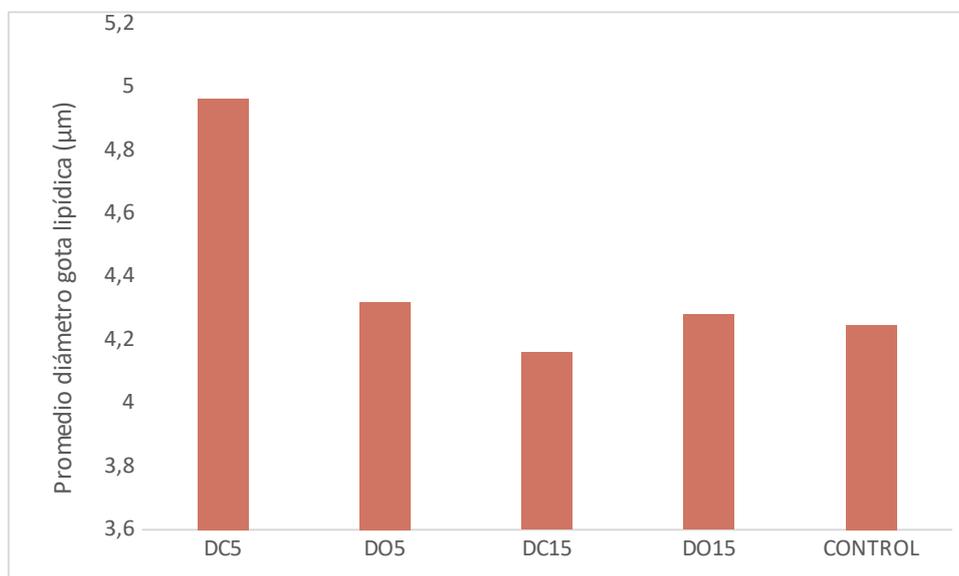


Figura 10. Promedio del diámetro de las gotas lipídicas observadas por cada dieta testada. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.



- Tamaño del núcleo de los hepatocitos: el tamaño nuclear de los hepatocitos en ninguno de los casos es menor que el determinado en la dieta control (Figura 11; Anexo I).



Figura 11. Promedio de la superficie nuclear observada por cada dieta testada. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

Por lo tanto, teniendo en cuenta estos resultados podemos concluir que ninguna de las dietas testadas ha generado el aumento de gotas lipídicas en hígado, ni la necrosis del tejido nuclear como consecuencia de una malnutrición en el pez. Cabría destacar, la heterogeneidad entre réplicas entre tanques con el mismo tratamiento e incluso entre los peces analizados del mismo tanque (ver Anexo I).

3.2. Experimento lubina

3.2.1. Crecimiento

Se registró una disminución del peso corporal final y del índice de crecimiento diario de los peces alimentados con la dieta CO en comparación con los peces alimentados con las dietas CTR y OS (Tabla 7). Sin embargo, *Codium* sp. molido y esterilizado en autoclave (dieta COAy extracto de polisacáridos de *Codium* sp. (dieta COP) mostraron un rendimiento de crecimiento similar en comparación con la dieta CTR. Aunque no fue estadísticamente significativa ($p = 0,005$), se observó una tendencia a la disminución del consumo de alimento en los peces alimentados con

dietas CO, COA y COP. No se observó ningún efecto de la composición de la dieta en la eficiencia alimenticia, la tasa de eficiencia proteica y la supervivencia.

Tabla 7. Rendimiento del crecimiento y eficiencia de utilización del alimento de la lubina alimentada con las dietas experimentales

	Dietas							SEM	p valor
	CTR	CO	COA	COP	OS	OSA	OSP		
Peso final	70.5 ^b	59.7 ^a	62.6 ^{ab}	63.3 ^{ab}	68.9 ^b	63.9 ^{ab}	63.6 ^{ab}	0.95	0.01
SGR¹	2.48 ^b	2.08 ^a	2.19 ^{ab}	2.22 ^{ab}	2.42 ^b	2.24 ^{ab}	2.23 ^{ab}	0.04	0.01
Alimento ingerido (g Kg ABW⁻¹ día⁻¹)²	20.7	19.5	19.5	19.5	20.8	19.5	20.0	0.16	0.05
FCR³	0.95	0.89	0.92	0.93	0.93	0.93	0.91	0.01	0.27
Tasa de conversión proteica⁴	2.28	2.14	2.19	2.20	2.22	2.19	2.14	0.01	0.14
Supervivencia (%)	97.3	97.3	98.7	100.0	98.7	98.7	100.0	0.41	0.50

Valores presentados como medias (n = 3). SEM: error estándar combinado de la media. Las letras en superíndice dentro de una fila representan diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05).

Peso corporal medio (ABW): (Peso corporal inicial + Peso corporal final) / 2.

¹Índice de crecimiento diario = [(Peso final 1/3 – Peso inicial 1/3) / Tiempo en días] x 100.

²Consumo de alimento = Consumo de alimento seco / Peso corporal medio / Días.

³Eficiencia alimenticia = Ganancia de peso húmedo / Consumo de alimento seco.

⁴Ratio de eficiencia proteica = Ganancia de peso húmedo/Ingesta de proteína bruta.

3.2.2. Ensayo de digestibilidad

El coeficiente de digestibilidad aparente (ADC) de la materia seca fue menor en los peces alimentados con la dieta CO en comparación con los grupos CTR y OS (Tabla 8). La dieta OSA condujo a un ADC más bajo de materia seca que la dieta CTR. En cuanto al ADC de proteína, las dietas CO y COA mostraron valores más bajos en comparación con la dieta CTR, y la dieta CO un valor más bajo que la dieta OS. El ADC de lípidos fue mayor en las dietas CTR y OS.

Tabla 8. Coeficientes de digestibilidad aparente (ADC¹) de las dietas experimentales.

	Dietas					SEM	p Valor
	CTR	COD	COA	OS	OSA		
Materia seca	73,8 ^c	64,6 ^a	68,5 ^{abc}	73,3 ^{bc}	67,4 ^{ab}	0,99	0,002
Proteína	94,4 ^c	91,9 ^a	92,9 ^{ab}	93,9 ^{bc}	93,1 ^{abc}	0,23	0,000
Lípidos	96,2	95,0	95,9	96,7	95,2	0,30	0,388

Valores presentados como medias (n = 4). SEM: error estándar combinado de la media. Las letras en superíndice dentro de una fila representan diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05).



1ADC = $[1 - ((\text{nivel de Cr}_2\text{O}_3 \text{ en la dieta} \times \text{nivel de nutrientes en las heces}) / (\text{nivel de Cr}_2\text{O}_3 \text{ en las heces} \times \text{nivel de nutrientes en la dieta}))] \times 100$.

3.2.3. Expresión génica

En comparación con los grupos de control, las dietas estudiadas no afectaron a la expresión de TNF- α e IL-10 (Figura 12). Sin embargo, la inclusión del extracto de polisacáridos de *Codium* produjo una mayor expresión de IL-1 β (4,1 veces) e IL-6 (2,2 veces). No se observaron otras diferencias significativas entre las dietas experimentales con respecto a la expresión génica relacionada con el sistema inmunitario.

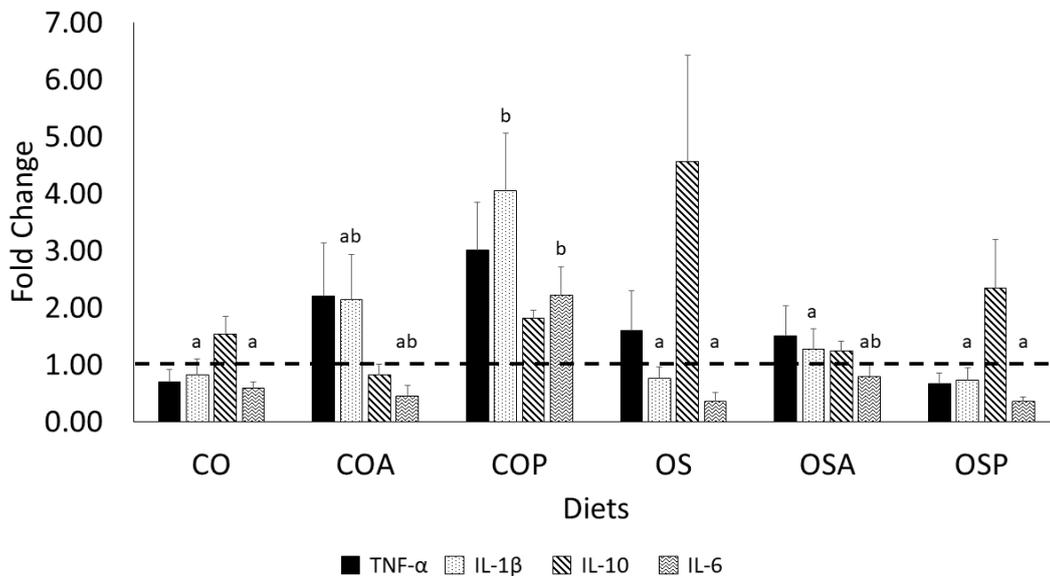


Figura 12. Expresión de genes relacionados con la inmunidad en el intestino distal de la lubina europea alimentada con las dietas experimentales. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar ($n = 9$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos dietéticos ($p < 0,05$).

4. CONCLUSIONES

4.1. Rodaballo

A fin de facilitar la comprensión de los resultados obtenidos, en la 9 se muestra una tabla resumen de los mismos.

Tabla 9. Resumen de los datos obtenidos por estudio.

	DC5	DO5	DC15	DO15	CONTROL
Parámetros de crecimiento				X	
Índices de conversión				X	
Índices de salud				X	
Análisis proximal					
○ Saturados			X		
○ Insaturados ⁽¹⁾		X			X
Análisis enzimático					
○ Amilasa				X	
○ Proteasa y tripsina		X			
Análisis histológico	X	X			

X: indica la dieta que mejores resultados presentó, por parámetro analizado

⁽¹⁾ La dieta control mostró mejores resultados (X) y de las dietas testadas DO5 (X)

Crecimiento

Al comparar el rendimiento del crecimiento de los peces alimentados con inclusión de macroalgas en sus dietas con respecto al control, no se observaron efectos negativos significativos. Además, hay una tendencia de mayor crecimiento en todos los casos, excepto en la dieta con inclusión de un 0,15% de extractos de *Codium* spp. Esta tendencia es más notable en las dietas con inclusión de *O. pinnatifida*, especialmente en la del 0,15% de extracto polisacárido.

Índices de conversión

Sólo existen diferencias significativas en el índice de eficiencia proteica (PER) en la dieta de inclusión de extractos de *O. pinnatifida*, presentando una mayor eficiencia alimenticia con respecto el resto, incluido el control. Resaltar que el grupo de peces que menos pienso ingirió fue el alimentado con 0.15% de extracto de *Codium* sp., por lo tanto, puede ser que la palatabilidad del pienso se vea afectada.

Índices de salud

Los dos índices de salud calculados (HSI y VSI) registran los valores significativamente más bajos en la dieta control y en la de inclusión de extracto de *O. pinnatifida*. La dieta con inclusión de extractos de *Codium* sp. presentó un VSI significativamente mayor que el resto de dietas testadas, por lo tanto, esta inclusión favorece la acumulación de grasa en las vísceras.

Análisis proximal

Las únicas diferencias significativas en la composición nutricional se encuentran en el porcentaje de ácidos grasos. La dieta con inclusión de extracto de *Codium* sp. presenta un porcentaje menor de ácidos grasos monoinsaturados con respecto a las otras dietas incluida el control. De igual modo el porcentaje de saturados también es menor en comparación del control o de la dieta con inclusión del 5% de esta alga. En general se aprecia que el contenido de ácidos grasos saturados es menor que el control o igual en el caso de la dieta con inclusión de *O. pinnatifida* al 5%.

Análisis enzimático

No existen diferencias significativas en la cuantificación de las enzimas seleccionadas. Aun así, se puede ver una tendencia en la que los intestinos de los peces alimentados con dietas con inclusión de *Codium* sp. presentan una menor concentración de estas enzimas y la introducción de *O. pinnatifida* favorecería la secreción de las enzimas involucradas en la digestión de carbohidratos y proteínas. La inclusión de un 5% afecta a la secreción de enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas y la de un 0.15% de extractos a la secreción de amilasas.

Análisis antiinflamatorio

Los resultados obtenidos en estos análisis, no han mostrados ningún patrón determinado entre las diferentes dietas testadas. No se aprecia ninguna tendencia entre los diferentes órganos analizados (hígado y bazo) por marcador, ni entre los distintos marcadores empleados. No existen diferencias significativas entre las dietas testadas, los valores obtenidos no superan los del control, por lo tanto, la inclusión de estas macroalgas no trajo consigo la inflamación de los órganos analizados.

Análisis histológico

El análisis histológico del hígado no evidencia signos de malnutrición, inanición o un efecto negativo de la dieta. Hay un menor porcentaje de gotas lipídicas en todas las dietas testadas en comparación del control, especialmente en las dietas con inclusión del 5% de macroalga.

Teniendo en cuenta lo anterior expuesto, y evaluando de una forma global todos los parámetros analizados; una dieta con inclusión de *O. pinnatifida* podría resultar beneficiosa por favorecer ligeramente el crecimiento sin afectar a la composición del músculo, a la salud del pez ni a los valores nutricionales finales. Por su contra, la inclusión de *Codium* sp. no se recomienda.

4.2. Lubina

Con el fin de facilitar la comprensión de los resultados obtenidos, en la Tabla 10 se muestra una tabla resumen de los mismos.

Tabla 10. Resumen de los datos obtenidos por estudio.

	CO	OS	COA	OSA	COP	OSP	CTR
Parámetros de crecimiento		X					X
Digestibilidad		X					X
Respuesta inmune					-		

X: indica la dieta que mejores resultados presentó, por parámetro analizado

-: indica la dieta que afectó negativamente

La incorporación de la macroalga *Codium* sp. afectó negativamente tanto a la digestibilidad de la dieta como al crecimiento de los peces, en comparación con las dietas de control y la dietas con incorporación de la macroalga *O. pinnatifida*.

Los extractos de polisacáridos de *Codium* sp. afectaron negativamente sobre la respuesta inmune de los peces, ya que se observó un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-6.

Codium sp. autoclavada mejoró la digestibilidad de la dieta, así como el crecimiento de los peces, con valores similares a los de la dieta CTR, mostrando así una mejora en la biodisponibilidad de los nutrientes para la lubina.

Se puede concluir que *O. pinnatifida* al 5% puede incluirse en dietas para lubinas europeas sin afectar a la digestibilidad de la dieta ni al crecimiento de los peces alimentados.

O. pinnatifida autoclavada y sus extractos de polisacáridos no mejoraron la biodisponibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos para la lubina europea.

Evaluando de forma global todos los parámetros analizados, la macroalga *O. pinnatifida* parece ser el alga más prometedora para incluir en las dietas de la lubina europea.

5. REFERENCIAS

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland, USA.

Cho, Y. C., Slinger, S., Bayley, H. 1982. Bioenergetics of salmonid fishes: Energy intake, expenditure and productivity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 73: 25-41.

Emre, Y., Ergün, S., Kurtoglu, A., Güroy, B., Güroy, D. 2013. Effects of Ulva Meal on Growth Performance of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) at Different Levels of Dietary Lipid. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 13: 841-846.

Furukawa, A., Tsukahara, H. 1966 . On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 32: 502-506.

Gong, Y., Sørensen, S.L., Dahle, D., Nadanasabesan, N., Dias, J., Valente, L.M.P., Sørensen, M., Kiron, V. 2020. Approaches to improve utilization of *Nannochloropsis oceanica* in plant-based feeds for Atlantic salmon. *Aquaculture* 522: 735122.

Magnoni, L.J., Martos-Sitcha, J.A., Queiroz, A., Calduch-Giner, J.A., Gonçalves, J.F.M., Rocha, C.M.R., Abreu, H.T., Schrama, J.W., Ozorio, R.O.A., Pérez-Sánchez, J. 2017 Dietary supplementation of heat-treated *Gracilaria* and *Ulva* seaweeds enhanced acute hypoxia tolerance in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biology Open* 6: 897-908.

Michalak, I., Chojnacka, K. 2018. Introduction: Toward Algae-Based Products, in *Algae Biomass: Characteristics and Applications: Towards Algae-based Products* (Chojnacka, K., Wieczorek, P.P., Schroeder, G., Michalak, I. eds.) pp 1-5, Springer International Publishing, Cham.

Peixoto, M.J., Ferraz, R., Magnoni, L.J., Pereira, R., Gonçalves, J.F., Calduch-Giner, J., Pérez-Sánchez, J., Ozório, R.O.A. 2019. Protective effects of seaweed supplemented diet on antioxidant and immune responses in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) subjected to bacterial infection. *Scientific Reports* 9: 16134.

Peixoto, M.J., Salas-Leitón, E., Pereira, L.F., Queiroz, A., Magalhães, F., Pereira, R., Abreu, H., Reis, P.A., Gonçalves, J.F.M., Ozório, R.O.A. 2016. Role of dietary seaweed supplementation on growth performance, digestive capacity and immune and stress responsiveness in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Reports* 3: 189-197.

Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Reserch* 29, e45.

Reyes-Becerril, M., Guardiola, F., Rojas, M., Ascencio-Valle, F., Esteban, M.Á. 2013. Dietary administration of microalgae *Navicula* sp. affects immune status and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & shellfish immunology* 35: 883-889.

Sony, N.M., Ishikawa, M., Hossain, M.S., Koshio, S., Yokoyama, S. 2019. The effect of dietary fucoidan on growth, immune functions, blood characteristics and oxidative stress resistance of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiology and Biochemistry* 45: 439-454.

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: 85-91.

Wassef, E., El-sayed, A.M., Sakr, E. 2013 *Pterocladia* (Rhodophyta) and *Ulva* (Chlorophyta) as feed supplements for European seabass, *Dicentrarchus labrax* L., fry. *Journal of Applied Phycology* online.



ANEXO I MICROSCOPIA ÓPTICA DE HÍGADO EN FUNCIÓN DE LA DIETA PROPORCIONADA

