



Evaluación de la inclusión de simbióticos de bacterias ácido-lácticas y microalgas hidrolizadas en piensos para dorada (*Sparus aurata*)

Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria
Trabajo de Fin de Máster



Autora:

Inmaculada Prieto Márquez

Tutores:

Dr. Antonio Jesús Vizcaíno Torres

Dr. Francisco Javier Alarcón López

Departamento de Biología y Geología

Universidad de Almería, julio 2021

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mis tutores de Trabajo Fin de Máster, D. Francisco Javier Alarcón López y D. Antonio Jesús Vizcaíno Torres por su ayuda, dedicación y entrega en el trabajo diario, y por su paciencia y perseverancia durante estos meses.

Agradecer también a D. Tomás Francisco Martínez Moya y a Dña. María Isabel Sáez Casado. En definitiva, un eterno agradecimiento al Departamento de Biología y Geología de la Universidad de Almería.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto “Evaluación de un simbiótico de microalgas hidrolizadas y bacterias ácido-lácticas para mejorar la sostenibilidad del cultivo de dorada (*Sparus aurata*) (Convocatoria de Jóvenes Investigadores CEI·MAR 2020), y la Spin Off de la Universidad de Almería LifeBioencapsulation S.L, y los proyectos DORALGAE (RTI2018-096625-B-C31) del Ministerio de Ciencias, Innovación y Universidades, y AquaTech4Feed (PCI2020-112204) de BLUEBIO-ERAMET-cofund y los fondos FEDER. Los piensos experimentales fueron elaborados en el Servicio Periférico de Investigación de Dietas Experimentales (SP-UDE) de la UAL y el ensayo de alimentación se realizó en el Servicio Central de Investigación en Cultivos Marinos (SC-ICM) de la UCA.

Además, me gustaría hacer una mención especial al Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), ya que me concedió la beca “Convocatoria de Ayudas para la realización de TFM en Empresas (Curso Académico 2020/21)”



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ingredientes utilizados en la elaboración de los piensos experimentales.....	16
Tabla 2. Composición proximal (g/100g de biomasa, MS) de los piensos experimentales.....	17
Tabla 3. Perfil de ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de los piensos experimentales....	17
Tabla 4. Composición proximal del músculo (g/100g de biomasa, MS) de los ejemplares.....	23
Tabla 5. Perfil de ácidos grasos (% total de ácidos grasos) del músculo de dorada.....	24
Tabla 6. Actividades enzimáticas digestivas de los extractos obtenidos (U/g de tejido) en los extractos intestinales de juveniles de dorada.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la producción de acuicultura y pesca mundial en el periodo 1952-2018.....	8
Figura 2. Diseño experimental de ensayo de alimentación de 80 días con juveniles de dorada.....	18
Figura 3. Evolución (A) y tiempo final (B) del peso corporal medio (peso fresco expresado en gramos) (A) de los juveniles de dorada alimentados con las dietas experimentales.....	22
Figura 4. Tasa de crecimiento específico (A) y tasa de eficiencia alimentaria (B) de los juveniles de dorada al final del ensayo de alimentación.....	22
Figura 5. Efecto de administración conjunta de un hidrolizado de microalgas y microorganismos probióticos sobre el contenido en Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en el músculo de los ejemplares de dorada al final del ensayo de alimentación.....	25
Figura 6. Substrato-SDS-PAGE de los extractos intestinales de los juveniles de <i>S. aurata</i> alimentados con piensos que incluyen distinta proporción de harina algal.....	27
Figura 7. Detalle de la cara apical de los enterocitos del intestino de los juveniles de dorada alimentados con las dietas experimentales. Imágenes SEM (escala: 20µm).....	28
Figura 8. Área apical de los enterocitos de los ejemplares de dorada alimentados con las dietas experimentales.....	28

ÍNDICE

1. RESUMEN	6
2. ABSTRACT	7
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1. Situación actual y perspectivas de la acuicultura.....	8
3.2. La importancia del cultivo de dorada en España.	9
3.3. La alimentación en acuicultura.	10
3.4. El uso de las microalgas en piensos para acuicultura.	11
3.5. El uso de probióticos en piensos para acuicultura.....	12
3.6. Utilización de simbióticos en acuicultura	13
4. OBJETIVO	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1. Microalgas y probióticos.	15
5.2. Piensos experimentales.....	15
5.3. Animales y diseño experimental.	15
5.4. Toma de muestras biológicas.....	18
5.5. Determinación de la composición proximal y el perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales y el musculo de dorada.	18
5.6. Determinación del grado de oxidación lipídica en músculo.	19
5.7. Cuantificación de las actividades enzimáticas digestivas.....	19
5.8. Visualización de la actividad proteasa alcalina mediante electroforesis SDS-PAGE.....	20
5.9. Estudio ultraestructural de la mucosa intestinal.....	21
5.10. Análisis estadístico.	21
6. RESULTADOS	22
6.1. Crecimiento y utilización de alimento.....	22
6.2. Composición proximal y perfil de ácidos grasos del músculo de dorada.	23
6.3. Oxidación lipídica.	25
6.4. Actividades enzimáticas digestivas.	25
6.5. Evaluación de la mucosa intestinal mediante microscopía electrónica de barrido.....	27
7. DISCUSIÓN	29
8. CONCLUSIONES	34
9. BIBLIOGRAFÍA	35

1. RESUMEN

El presente proyecto aborda la evaluación *in vivo* de los posibles efectos derivados de la administración de compuestos simbióticos constituidos por microorganismos probióticos y microalgas hidrolizadas en el pienso para ejemplares juveniles de dorada (*Sparus aurata*). Para ello, se llevó a cabo un ensayo de alimentación de 80 días de duración en el que se evaluaron cuatro piensos experimentales que contenían 10^9 (ufc kg^{-1}) de dos cepas probióticas solas o en combinación con un 5% (p/p) de un hidrolizado de algas. Se utilizó una dieta libre de aditivos como control. Al final del ensayo de alimentación se registró el peso final de los individuos y se tomaron muestras biológicas para determinar la composición proximal, el perfil de ácidos grasos y el estado oxidativo del músculo, y para la evaluación de la funcionalidad digestiva mediante la determinación de los niveles actividad de las enzimas digestivas y el estudio de la estructura de la mucosa intestinal mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Los resultados obtenidos revelaron que la incorporación de microorganismos probióticos ácido lácticos aislados o en combinación con un hidrolizado de microalgas no ejerció efectos negativos sobre el crecimiento y el aprovechamiento de nutrientes. Ninguno de los tratamientos evaluados modificó la composición proximal y el perfil de ácidos grasos del músculo, mientras que se observó un incremento de la respuesta antioxidante frente en los ejemplares alimentados con los piensos suplementados con probióticos y microalgas. Las actividades de quimotripsina, proteasa alcalina total y leucina aminopeptidasa fueron mayores en los peces alimentados con dietas suplementadas con aditivos. Por su parte, la evaluación de la ultraestructura de la mucosa intestinal reveló ausencia de alteraciones negativas. En general, los resultados obtenidos confirman que el uso de simbióticos constituidos por microorganismos probióticos y microalgas hidrolizada podría mejorar no solo la capacidad de digestión y absorción intestinal sino también la capacidad antioxidante de los juveniles de dorada.

2. ABSTRACT

This work addresses the *in vivo* evaluation of the possible effects derived from the administration of symbiotic compounds making up by probiotic microorganisms together with hydrolysed microalgae in the feed for juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). An 80-day feeding trial was carried out using four experimental diets containing 10^9 (cfu/kg) of two probiotic strains alone or in combination with 5% (w/w) of the algal hydrolysate. A microalgae-free diet was used as control. At the end of the feeding trial, fish body weight was recorded for growth evaluation and biological samples were obtained for analysis of muscle proximate composition, fatty acids profile and lipid oxidation determination, and for the evaluation of the digestive functionality by determining of digestive enzyme activities and intestinal mucosa morphological evaluation by scanning electron microscopy (SEM). Results obtained revealed that dietary inclusion of lactic acid probiotic microorganisms alone or combined with microalga hydrolysate had no negative effects on growth and nutrient utilization. None of the treatments modified muscle fatty acids and proximate composition, whereas an increase of the antioxidant response in fish fed on probiotics and microalgae supplemented diets was observed. Chymotrypsin, total alkaline protease, and leucine aminopeptidase activities were higher in fish fed diets supplemented with additives. The ultrastructural evaluation of the intestinal apical brush border membrane revealed absence of negative alterations. Overall, the results obtained confirmed that the use of symbiotic from probiotics and hydrolysed microalgae might improve not only the intestinal digestion and absorption capacity but also the antioxidant capacity of juvenile gilthead seabream.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Situación actual y perspectivas de la acuicultura.

La producción acuícola mundial ha crecido de manera continuada durante las últimas décadas. Según las últimas estadísticas facilitadas por la Organización para la Agricultura y la Alimentación de Naciones Unidas (FAO), el crecimiento interanual ha sido del 5,9% de media entre los años 2000 y 2018, alcanzándose este último año un nuevo máximo histórico con un total de 114,5 millones de toneladas (Mt) (peso vivo), tan solo un 2,0% más que en 2017, aunque superando a la producción acuícola pesquera (97,4 Mt) por sexto año consecutivo (Figura 1) (FAO, 2020; APROMAR, 2020).

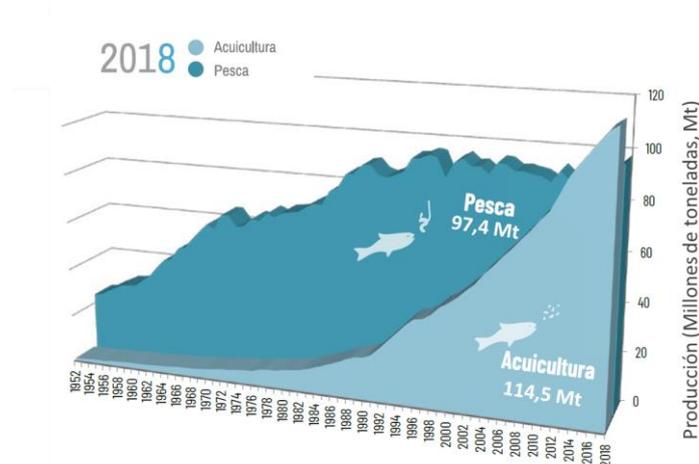


Figura 1. Evolución de la producción de acuicultura y pesca mundial en el periodo 1952-2018. Fuente: APROMAR, 2020.

Este progreso de la acuicultura revela no solo la vitalidad de esta actividad como técnica productiva, sino también la capacidad de innovación, emprendimiento y aprovechamiento sostenible de los recursos disponibles. De esta manera, se prevé que en un futuro la acuicultura será la manera habitual de producción de productos acuáticos. El informe *Fish to 2030* (Msangi *et al.*, 2013) considera que la producción total de pescado aumentará a 187 millones de toneladas en 2030, siendo el principal aumento causa de la acuicultura. Además, según este informe se espera que después de 2030 se produzca un predominio de la acuicultura, que suministrará más del 60% del pescado para consumo humano directo en el mundo.

A nivel nacional, existen unos hábitos considerables de consumo de pescado, siendo uno de los países de la Unión Europea con mayor volumen de producción acuícola, con 342.867 toneladas en 2019 (APROMAR, 2019). De hecho, España es el tercer país productor de pescado de la UE, con 60.535 toneladas (8,7 %) por detrás de Reino Unido y Grecia (APROMAR, 2020).

Actualmente, las especies de mayor volumen de producción acuícola a nivel nacional son: el mejillón (261.513 toneladas), seguido por la lubina (27.335 toneladas), la trucha arco iris (18.955 toneladas) y la dorada (13.521 toneladas) (APROMAR, 2020). La acuicultura continental está basada en el cultivo de la trucha arcoiris (*Onchorhynchus mikiss*), mientras que la marina se centra en el cultivo de la dorada (*Sparus aurata*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*).

3.2. La importancia del cultivo de dorada en España.

La dorada, *Sparus aurata*, es uno de los peces más apreciados en acuicultura con una producción acuícola total en Europa y el resto del Mediterráneo en 2019 estimada en 252.406 toneladas, siendo los principales productores Turquía con 85.000 toneladas (33,7 % de la producción total), Grecia con 65.300 toneladas (el 25,9 %), Egipto con 36.000 toneladas (14,3 %), Túnez con 16.000 toneladas (6,3 %) y España con 13.521 toneladas (5,4 %) (APROMAR, 2020).

La producción de dorada de acuicultura en España en 2019 fue de 13.521 toneladas, un 9,4 % menos que en 2018, concentrándose la producción en la Comunidad Valenciana con 6.629 toneladas (49% del total), seguido de la región de Murcia con 2.906 toneladas (21,5%), Canarias (2.380 toneladas, 17,6%) y Andalucía (1.606 toneladas, 11,9%) (APROMAR, 2020).

Es un perciforme que pertenece a la familia de los espáridos. Se caracteriza por un cuerpo ovalado, alto y aplanado lateralmente. La cabeza es grande y con perfil arqueado. Es de color gris plateado con una mancha oscura al principio de la línea lateral además de una pequeña banda escarlata en el borde superior del opérculo. Presenta una banda amarilla característica en la frente, entre los ojos, y que es más patente en los individuos adultos, y sobre la que aparece otra banda de color negro. Tiene una aleta caudal ahorquillada y puede alcanzar un tamaño de hasta 57 cm de longitud. Es un animal hermafrodita proterándrico (primero madura como macho y a partir del segundo o tercer año se convierte en hembra) que puede vivir más de 10 años (APROMAR, 2020).

Su crianza se realiza en la mayoría de los países mediterráneos. Los centros de reproducción (“hatcheries”) producen huevos a partir de individuos reproductores en condiciones controladas. Durante su primer mes de vida en cultivo, las larvas se alimentan de organismos vivos: artemia y rotíferos. Seguidamente, inician una alimentación con piensos artificiales elaborados a partir de materias primas naturales. Las instalaciones de crianza son diversas: viveros flotantes en el mar, tanques de hormigón o estanques en tierra. Cada dorada tarda entre 18 y 24 meses en alcanzar 400 g desde que eclosiona del huevo, abarcando la talla comercial desde los 250 g hasta más de 2 Kg (APROMAR, 2020).

3.3. La alimentación en acuicultura.

El adecuado desarrollo de alimentos específicos, junto con una adecuada gestión de la biología de las especies cultivadas y la introducción de innovaciones tecnológicas, son algunos de los factores clave del éxito de la acuicultura moderna.

Desde un punto de vista nutricional, todos los piensos formulados para la alimentación acuícola deben suministrar los nutrientes necesarios para un adecuado crecimiento del pez, ajustando su composición a las necesidades nutritivas y fisiológicas intrínsecas de la especie a la que vayan destinados. La base de la mayoría de las fórmulas empleadas para la elaboración de piensos acuícolas está representada por las harinas y aceites de pescado (Yadav *et al.*, 2021). Ambas materias primas presentan una elevada digestibilidad, así como un elevado valor nutritivo, proporcionando aminoácidos esenciales, fosfolípidos y ácidos grasos omega-3, como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el eicosapentaenoico (EPA), además son una fuente importante de minerales (calcio, fósforo y magnesio), vitaminas (B12, A, D3, colina, inositol y vitamina C) y oligoelementos (de la Higuera y Cardenete, 1993; Yarnold *et al.*, 2019). Sin embargo, la elevada demanda de estos ingredientes ocasionada por el rápido incremento de la industria acuícola ha generado un incremento en los precios lo que a su vez ha llevado a un incremento de los costes de producción del pienso (Naylor *et al.*, 2000). En este sentido, durante los últimos años se está realizando un esfuerzo para reducir las tasas de inclusión de harina y aceite de pescado en los alimentos acuícolas, aunque debido al anteriormente mencionado aumento de la producción, la búsqueda de fuentes alternativas de proteínas y lípidos sigue siendo un desafío para la acuicultura actual (Yarnold *et al.*, 2019).

Por otro lado, para que el desarrollo de negocio sea sostenible y respetado por el consumidor, se debe tener en cuenta que la nutrición de los peces es esencial no solo para mejorar la producción y rentabilidad de la acuicultura, sino también para garantizar el bienestar de los animales (Duarte Pesantes y Marcillo Morla, 2007). La salud de los peces se considera uno de los mayores problemas del sector, y un reto para su desarrollo sostenible, por lo que la propia industria acuícola demanda el desarrollo de nuevas estrategias y herramientas relacionadas con la incorporación de ingredientes y/o aditivos funcionales que garanticen ambos aspectos (Bharathi *et al.*, 2019). Según Gabriela *et al.* (2007) *“un alimento puede considerarse funcional si se demuestra satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas”*.

3.4. El uso de las microalgas en piensos para acuicultura.

Durante los últimos años, las microalgas han adquirido un gran interés dentro del campo de la nutrición acuícola, debido a su potencial para reducir la dependencia de las materias primas convencionales y como aporte complementario de lípidos, vitaminas, minerales y otras sustancias bioactivas de interés (Tibaldi *et al.*, 2015; Vizcaíno *et al.*, 2016). En general, se ha observado que su incorporación en piensos para acuicultura ejerce efectos satisfactorios sobre diferentes aspectos del desarrollo de los peces como el crecimiento, la composición muscular próxima y la funcionalidad digestiva (de Cruz *et al.*, 2018; Vizcaíno *et al.*, 2018; Gong *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020).

Desde un punto de vista nutricional, las microalgas se caracterizan por poseer un elevado contenido en proteína (30-55% en materia seca, MS), con un perfil de aminoácidos equilibrado, similar al encontrado en otros ingredientes comúnmente utilizados en alimentación acuícola (Becker, 2007). El contenido en lípidos varía entre un 20 y un 50% (MS) destacando la presencia de ácidos grasos poliinsaturados como el araquidónico (ARA, 20:4n-6), el eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) y el docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3) (Brown, 2002), y el de hidratos de carbono entre un 5 y un 35% (MS) (Percival y Turvey, 1974). Sin embargo, existen lagunas técnicas como la digestibilidad y los costos de producción que deben abordarse antes de que puedan incorporarse en fórmulas comerciales.

En este sentido, la utilización de hidrolizados de microalgas se presenta como una opción de interés para su inclusión en piensos acuícolas. Los procesos de hidrólisis llevados a cabo mediante la aplicación de enzimas proteasas y carbohidrasas consiguen mejorar las propiedades nutritivas y funcionales de la materia prima proteica original proporcionando péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres con mayor biodisponibilidad, así como péptidos bioactivos que ejerzan una actividad beneficiosa en los peces (Chalamaiah *et al.*, 2012). Además, se produce una mejora de la biodisponibilidad de los polisacáridos complejos presentes en la pared celular y de otros compuestos internos que se traduce en que incluso niveles bajos de inclusión de estas microalgas hidrolizadas podrían mejorar los aspectos fisiológicos de manera similar a la observada cuando se incorporan mayores cantidades de biomasa cruda (Tchorbanov y Bozhkova, 1988).

3.5. El uso de probióticos en piensos para acuicultura

Además de una correcta nutrición, la salud y el bienestar de los animales son dos aspectos prioritarios en el sector acuícola para que el desarrollo del modelo de negocio sea sostenible y respetado por el consumidor (Duarte Pesantes y Marcillo Morla, 2007). La propia industria acuícola demanda el desarrollo de nuevas estrategias y herramientas que garanticen tanto el buen crecimiento como la salud de los peces. Por lo que, en este nuevo escenario, la salud de los peces es uno de los mayores problemas del sector, y un reto para su desarrollo sostenible.

Generalmente, las soluciones más habituales frente a las infecciones bacterianas se han basado en el uso de agentes químicos antimicrobianos, que se consideran remedios rápidos, efectivos y de aplicación sencilla. Sin embargo, la mayoría de estos productos impactan negativamente en el medio ambiente y en la salud animal y humana debido a su toxicidad (Sorroza *et al.*, 2009). De hecho, la Unión Europea ha prohibido el uso de medicamentos veterinarios (incluidos los antibióticos), por lo que es obligatorio establecer estrategias alternativas para prevención y tratamiento de patologías de los peces en cultivo. En este sentido, el empleo de probióticos en el campo de la acuicultura ha adquirido una gran importancia siendo en muchos casos una alternativa eficaz para la prevención de enfermedades frente al uso de antibióticos (Akhter *et al.*, 2015). De hecho, el número de publicaciones científicas relacionadas con el uso de microorganismos probióticos en acuicultura se han multiplicado por 10 desde en los últimos 20 años.

En general, un probiótico se puede definir como una célula bacteriana viva, que se administra a través del alimento o del agua, que ejerce un efecto beneficioso al huésped al mejorar la resistencia a enfermedades, el estado de salud, el rendimiento del crecimiento, la utilización del alimento o la respuesta al estrés, mediante la mejora del equilibrio microbiano del huésped o del medio ambiente (Dawood *et al.*, 2018). Dentro del campo de la nutrición acuícola, los probióticos pueden actuar como fuente de nutrientes, además de proporcionar enzimas, que no solo mejoran la digestión, sino que también controlan el sistema inmunológico y aumentan su respuesta frente a microorganismos patógenos (Merrifield *et al.*, 2010). De hecho, se ha comprobado la viabilidad y eficacia de una amplia gama de microorganismos probióticos siendo los más ampliamente utilizados las bacterias del ácido láctico, *Bacillus* sp. y las levaduras (Cerezuela *et al.*, 2012).

3.6. Utilización de simbióticos en acuicultura

Los simbióticos son una combinación de probióticos y prebióticos que afecta beneficiosamente al organismo, ya que mejoran la supervivencia de los microorganismos vivos (probióticos) en el tracto gastrointestinal de los organismos (Collins y Gibson, 1999), pudiendo tener un efecto sinérgico que mejora el efecto que tienen al administrarse por separado (Cerezuela *et al.*, 2012). Numerosos estudios han evaluado el efecto de la incorporación de simbióticos en pienso constituidos principalmente por principalmente por mananoligosacáridos y fructooligosacáridos junto con microorganismos probióticos, observándose, de manera general efectos positivos sobre el rendimiento del crecimiento, la actividad de las enzimas digestivas que conduce a la eficiencia del sistema digestivo y la respuesta inmuno-hematológica en los peces (Dawood *et al.*, 2020). A pesar de ello, se requieren nuevas investigaciones acerca de las implicaciones y los efectos de diferentes probióticos, prebióticos y simbióticos sobre crecimiento y aprovechamiento de los nutrientes, fisiología intestinal e la inmunología en peces de acuicultura.

En este sentido, las microalgas y especialmente los hidrolizados de microalgas pueden contribuir como potencial prebiótico al contener sustancias como oligosacáridos, exopolisacáridos, etc, que favorecen el desarrollo de los microorganismos probióticos (Dewood *et al.*, 2018). Estos polisacáridos procedentes de los hidrolizados de microalgas presentan una enorme variedad de estructuras y se consideran como una fuente extraordinaria de prebióticos (Senni *et al.*, 2011). De hecho, se ha observado que polisacáridos procedentes de microalgas son una fuente efectiva para promover el crecimiento y la proliferación de bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus* sp. o *Bifidobacterium* sp. que son dos ejemplos de microorganismos probióticos ampliamente estudiados (Gupta *et al.*, 2017). Por lo tanto, la administración conjunta en el pienso del hidrolizado de microalgas y los microorganismos probióticos, podría constituir un preparado con potencial simbiótico, y representa la principal innovación del presente estudio, pretendiéndose obtener un efecto sinérgico, generándose una respuesta mayor que con la administración de estos aditivos por separado.

4. OBJETIVO

El objetivo general es la evaluación de la inclusión en piensos para acuicultura de un simbiótico de bacterias ácido-lácticas y microalgas hidrolizadas, el cual a priori, posibilita mejorar la calidad nutricional con respecto a las fórmulas comerciales, así como promover efectos sinérgicos sobre el estatus fisiológico de los organismos incluyendo el crecimiento, funcionalidad digestiva y estado oxidativo en juveniles de dorada (*Sparus aurata*).

El objetivo global del proyecto contempla dos objetivos específicos:

1. Evaluar los efectos de la administración conjunta de microorganismos probióticos y un hidrolizado de microalgas y sobre el crecimiento, la composición química, perfil de ácidos y el estado oxidativo de músculo.
2. Estudiar la influencia de su administración sobre la funcionalidad digestiva del pez, mediante la evaluación de las enzimas digestivas y la integridad de la mucosa intestinal.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Microalgas y probióticos.

Para el presente trabajo se han utilizado dos cepas de microorganismos probióticos ácido-lácticos (P-326 y P-455) y un hidrolizado de microalgas proporcionados por la Spin-off LifeBioencapsulation S.L. Para el hidrolizado de microalgas, se partió de una mezcla de microalgas compuesta, entre otras, por biomasa de *Arthrospira* sp. y *Nannochloropsis* sp. que fue sometida a un proceso de hidrólisis enzimático bajo condiciones óptimas tiempo, temperatura y relación enzima:sustrato. Para la hidrólisis se utilizó un coctel enzimático que contiene enzimas con actividad xilanasa, β -glucanasa, celulasa y proteasa proporcionado por LifeBioencapsulation S.L.

5.2. Piensos experimentales.

Se formularon cinco dietas isoproteicas (43%, materia seca) e isolipídicas (20%, materia seca), comprendidas por: i) una dieta control sin aditivos (CT) y ii) cuatro dietas experimentales, dos dietas con 10^9 ufc (unidades formadoras de colonias) por kg de pienso de los microorganismos probióticos ácido-lácticos P-326 (P1) y P-455 (P2) y otras dos con los mismos probióticos más un 5% de un hidrolizado de microalgas (P1-M y P2-M). Todas las dietas experimentales fueron elaboradas en el Servicio de Piensos Experimentales de la Universidad de Almería.

Para la fabricación de los piensos, los ingredientes sólidos se mezclaron durante 20 min en una amasadora Sammic® BM-11 (Sammic SL. Azpeitia, España), seguidamente se añadieron los ingredientes líquidos y el cloruro de colina disuelto en agua destilada. La mezcla resultante se transfirió de nuevo a la amasadora durante un periodo adicional de 15 min. Una vez obtenida la masa, se procedió al granulado con una granuladora Braher® P22-82 (Braher Internacional S.A. Andoain, España), obteniendo gránulos de 2 y 3 mm de diámetro. El secado de los piensos se realizó en una estufa convencional a 40°C, y una vez elaborados, estos fueron almacenados a -20°C hasta su uso. Los distintos ingredientes empleados para la preparación de los piensos experimentales se detallan en la Tabla 1. La composición proximal y el perfil de ácidos grasos de los piensos experimentales se muestran la Tabla 2 y Tabla 3, respectivamente.

5.3. Animales y diseño experimental.

Se ha llevado a cabo un ensayo de alimentación con el objetivo de evaluar los efectos de la administración conjunta de un hidrolizado de microalgas y microorganismos probióticos sobre

el crecimiento y la funcionalidad digestiva de ejemplares juveniles de dorada (*S. aurata*). El ensayo se realizó en las instalaciones de los Servicios Centrales de Investigación en Cultivos Marinos (SC-ICM) de la UCA (código REGA ES11028000312). Se utilizaron 300 ejemplares juveniles de dorada ($25,0 \pm 0,27$ g, peso medio inicial) proporcionados por (Planta de Cultivos Marinos de la Universidad de Cádiz (Puerto Real, Cádiz). Tras un periodo de aclimatación de 15 días alimentándose con una dieta comercial, los peces fueron distribuidos aleatoriamente en 15 tanques experimentales de 300L de capacidad a razón de 20 individuos por tanque (densidad de carga inicial 2 kg/m^3). Una vez iniciado el ensayo de crecimiento, los peces se alimentaron “*ad libitum*” con los piensos experimentales. Cada tratamiento se ensayó por triplicado durante un periodo de 80 días, bajo condiciones naturales de fotoperiodo y a temperatura constante ($19\text{-}20^\circ\text{C}$). Diariamente se ajustaron los caudales de entrada de agua, y se registraron los niveles de oxígeno disuelto y nitritos. Al final del ensayo de alimentación se tomaron medidas del peso de los animales para la determinación de la tasa de crecimiento. La Figura 2 muestra el diseño experimental del ensayo de alimentación.

Tabla 1. Ingredientes utilizados en la elaboración de los piensos experimentales.

Ingredientes (g/kg materia seca)	Pienso CT	Pienso enriquecido con microalgas
Harina de pescado LT94 ¹	120	120
Microalgas hidrolizadas ²		50
Concentrado de soja Soyalem ³	350	342
Gluten de trigo ⁴	150	139
Harina de trigo ⁵	129	105
Aceite pescado	90	90
Aceite de colza	50	43
Aceite de lino	10	10
Lecitina de soja	10	10
Lisina	40	40
Metionina	6	6
Krill+calamar+CPSP ⁶	30	30
Cloruro de colina	2,5	2,5
Betaína	0,25	0,25
Vitaminas y minerales ⁷	20	20
Vitamina C	1	01
Fosfato bicálcico	5	5
Goma guar	20	20

Códigos: CT: dieta libre de microalgas; P1: 10^9 ufc del probiótico (P-); P1-M: 10^9 ufc del probiótico (P-) + 5% del hidrolizado de microalgas; P2: 10^9 ufc del probiótico (P-); P1-M: 10^9 ufc del probiótico (P-) + 5% del hidrolizado de microalgas. ¹(proteína: 69,4%; lípidos: 12,3%),

Norsildemel (Bergen, Noruega); ²(proteína: 32%; lípidos: 15%); ³(proteína: 53%; lípidos: 1%); ⁴(proteína: 76%; lípidos: 1,9%); ⁵(proteína: 12,0%; lípidos: 2,0%); ⁶(proteína: 56,0%; lípidos: 8,0%); ⁸Premezcla de minerales y vitaminas de acuerdo con Pereira y Oliva-Teles (2003).

Tabla 2. Composición proximal (g/100g de biomasa, MS) de los piensos experimentales.

	Proteína cruda	Lípidos totales	Humedad	Cenizas
CT	42,91 ± 0,49	19,92 ± 0,12	6,65 ± 0,25	6,53 ± 0,31
P1	43,31 ± 0,88	20,28 ± 0,34	0,66 ± 0,11	6,28 ± 0,02
P1-M	43,63 ± 0,44	20,04 ± 0,30	6,38 ± 0,25	6,28 ± 0,07
P2	43,75 ± 0,09	20,47 ± 0,41	7,21 ± 0,16	6,84 ± 0,12
P2-M	43,31 ± 1,15	19,60 ± 0,09	7,20 ± 0,06	6,71 ± 0,21

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos (% total de ácidos grasos) de los piensos experimentales.

	CT	P1	P1-M	P2	P2-M
14:0	1,98 ± 0,01	1,96 ± 0,01	2,13 ± 0,02	1,96 ± 0,02	2,10 ± 0,02
16:0	16,04 ± 0,02	16,04 ± 0,02	16,93 ± 0,04	16,12 ± 0,10	16,77 ± 0,06
18:0	4,48 ± 0,02	4,48 ± 0,03	4,62 ± 0,03	4,48 ± 0,03	4,56 ± 0,00
16:1n-7	2,87 ± 0,03	2,81 ± 0,01	2,97 ± 0,01	2,80 ± 0,02	2,96 ± 0,00
18:1n-7	1,93 ± 0,00	1,90 ± 0,00	1,96 ± 0,02	1,94 ± 0,02	1,92 ± 0,02
18:1n-9	28,78 ± 0,03	29,17 ± 0,02	28,10 ± 0,13	28,70 ± 0,19	27,46 ± 0,14
20:1n-9	1,30 ± 0,00	1,33 ± 0,01	1,35 ± 0,02	1,31 ± 0,02	1,34 ± 0,00
18:2n-6	16,70 ± 0,11	17,22 ± 0,05	16,69 ± 0,02	17,22 ± 0,12	16,71 ± 0,03
18:3n-3	6,08 ± 0,02	6,36 ± 0,01	6,50 ± 0,21	6,29 ± 0,04	6,38 ± 0,17
16:3n-4	0,68 ± 0,00	0,68 ± 0,00	0,71 ± 0,01	0,67 ± 0,00	0,70 ± 0,00
18:4n-3	0,41 ± 0,04	0,40 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,39 ± 0,00	0,39 ± 0,00
20:4n-6 (ARA)	1,01 ± 0,00	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,01	0,98 ± 0,01	1,01 ± 0,01
20:4n-3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:5n-3 (EPA)	4,14 ± 0,02	4,11 ± 0,01	4,11 ± 0,02	4,08 ± 0,02	4,10 ± 0,01
22:5n-3	0,88 ± 0,02	0,87 ± 0,01	0,86 ± 0,02	0,84 ± 0,01	0,85 ± 0,04
22:6n-3 (DHA)	11,72 ± 0,01	10,71 ± 0,04	10,70 ± 0,10	11,24 ± 0,54	11,77 ± 0,01
SFA	22,50 ± 0,05	22,47 ± 0,00	23,68 ± 0,03	22,56 ± 0,14	23,43 ± 0,04
MUFA	34,88 ± 0,00	35,20 ± 0,02	34,38 ± 0,17	34,76 ± 0,21	33,69 ± 0,12
PUFA	40,95 ± 0,09	40,68 ± 0,01	40,26 ± 0,10	41,04 ± 0,36	41,20 ± 0,18
Otros	1,61 ± 0,00	2,90 ± 0,02	2,64 ± 1,30	3,21 ± 0,24	2,66 ± 1,34
n-3	23,24 ± 0,01	22,45 ± 0,04	22,57 ± 0,10	22,84 ± 0,50	23,49 ± 0,21
n-6	17,71 ± 0,10	18,23 ± 0,03	17,70 ± 0,00	18,21 ± 0,13	17,71 ± 0,03
n-9	30,08 ± 0,03	30,49 ± 0,02	29,45 ± 0,15	30,01 ± 0,21	28,80 ± 0,14
n-3/n-6	1,31 ± 0,01	1,23 ± 0,00	1,28 ± 0,01	1,25 ± 0,04	1,33 ± 0,01
EPA/DHA	0,35 ± 0,01	0,38 ± 0,05	0,38 ± 0,03	0,36 ± 0,02	0,35 ± 0,05

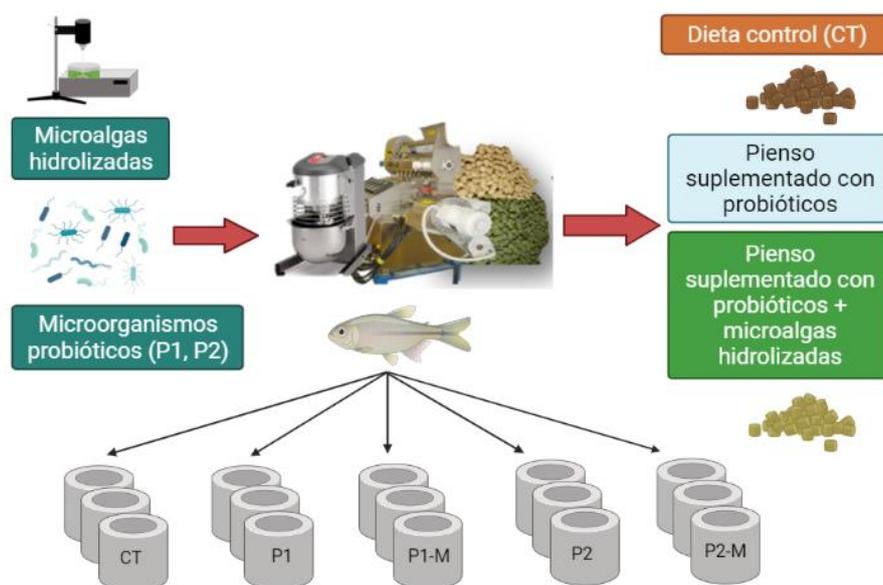


Figura 2. Diseño experimental de ensayo de alimentación de 80 días con juveniles de dorada (25 g, peso medio inicial).

5.4. Toma de muestras biológicas.

Al final del ensayo de alimentación los peces se anestesiaron y sacrificaron mediante una incisión en la columna vertebral a la altura de los opérculos de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Se tomaron muestras de músculo e intestino. Las muestras de músculo fueron utilizadas para la posterior determinación de la composición proximal y el perfil de ácidos grasos y para la determinación del estado de oxidación lipídica. Por su parte, las muestras de intestino fueron procesadas para para el análisis de la actividad enzimática digestiva y para la evaluación de la integridad del epitelio mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

5.5. Determinación de la composición proximal y el perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales y el músculo de dorada.

Se determinó el contenido en proteína cruda, lípidos totales, humedad y ceniza tanto en pienso como en muestras de músculo previamente liofilizadas. El contenido en proteína cruda se cuantificó mediante un análisis elemental (C:H:N) empleando un analizador elemental de la marca ELEMENTAR Vario Micro CHNS (Número de serie: 15095079) fabricado por Elementar Analysensysteme GmbH, Donaustrasse 7, 63452 Hanau (Alemania), multiplicando el

contenido de nitrógeno de cada una de las muestras por 6,25 (Sánchez-Lozano *et al.*, 2007). El contenido en lípidos totales se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Folch (1957). Brevemente, los lípidos fueron extraídos con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v). Seguidamente el solvente orgánico fue evaporado en estufa a 100°C, y el contenido lipídico se determinó por gravimetría. La humedad de los peces fue determinada por gravimetría. Las cenizas fueron determinadas por gravimetría tras incineración de 1g del filete liofilizado en un horno mufla a 550°C durante 24 horas según el método estándar (AOAC, 2000).

El perfil de ácidos grasos se determinó mediante cromatografía de gases de acuerdo con la metodología descrita por Rodríguez-Ruiz *et al.* (1998). El análisis se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard, modelo 4890 Series II (Hewlett Packard Company, Avondale, PA) usando una modificación del método de transesterificación directa descrito por Lepage y Roy (1984) que no necesita separación previa de la fracción lipídica y que permite un ahorro de tiempo y reactivos.

5.6. Determinación del grado de oxidación lipídica en músculo.

La oxidación del lípido en muestras del músculo fue estimada por las sustancias ácido-reactivas tiobarbitúricas (TBARS) según el método de Buege y de Aust (1978). Las muestras (1 g) se homogeneizaron en 4 ml 50 mM NaH₂PO₄, en solución tritón X-100 al 0,1% (v/v). La mezcla fue centrifugada (10.000 ×g, 20 minutos, 4°C) y los sobrenadantes se mezclaron en una proporción 1:5 (v/v) con el reactivo del ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,375% w/v TBA, el 15% w/v TCA, 0,01% w/v 2,6 di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) y 0,25 N HCl). La mezcla se calentó durante 15 min y se centrifugó (3.600 g, 10 min, 4°C). Posteriormente, la absorbancia de los sobrenadantes se midió a 535 nm. La cantidad de TBARS se expresó como mg de malondialdehído (MDA) por kg de músculo después de comparar con un estándar de MDA.

5.7. Cuantificación de las actividades enzimáticas digestivas.

Para la determinación de las actividades enzimáticas digestivas se prepararon extractos enzimáticos a partir de las muestras de intestino de dorada, tomadas al azar de cada uno de los tanques ensayados. Brevemente, las muestras de intestino se homogenizaron en agua destilada (0,5 g de tejido por mililitro) empleando un Potter de vidrio esmerilado. Seguidamente, el homogenizado se sonicó en frío utilizando un sonicador “Branson Sonifier 150 Digital Ultrasonic Liquid Processor Cell Disruptor Homogenizer”, mediante cuatro pulsos de diez segundos, y se centrifugó a 4°C y 12.000 rpm durante 20 minutos, usando la centrífuga

“SIGMA Modelo 2-16PK”. A continuación, se recuperó el sobrenadante y se repartió en alícuotas para su conservación a -20°C hasta su posterior análisis.

La actividad proteasa alcalina se midió según la metodología descrita por Alarcón *et al.* (1998) utilizando caseína al 1% (p/v) tamponada en Tris-HCl 100 mM a pH 9 como sustrato. La actividad de tripsina y quimotripsina fue determinada usando como sustrato BAPNA 0,5 mM (N- α -benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida) de acuerdo con la metodología descrita por Erlanger *et al.* (1961) y SAPNA 0,2 mM (N-succinil-(Ala)₂-Pro-Phe-P-nitroanilida) de acuerdo con DelMar *et al.* (1979), respectivamente. En ambos casos, se utilizó tampón Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM, a pH 8,5. La actividad leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina se midieron usando como sustrato L- leucina- p- nitroanilida (LpNa) 2 mM en un buffer Tris HCl 100 mM, a pH 8,8 (Pfeiderer, 1970) y p- nitrofenil fosfato en un buffer de dietanolamina 1 M, a pH 9,5, que contiene MgCl₂ 1mM (Bergmeyer, 1974), respectivamente. Para tripsina, quimotripsina y leucina aminopeptidasa, una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que libera un μ mol de p-nitroanilida (pNa) por minuto, usando como coeficiente de extinción 8.800 M cm⁻¹ medida espectrofotométricamente a 405 nm. Para la actividad fosfatasa alcalina se consideró que una unidad de actividad enzimática correspondía a la cantidad de enzima que libera un μ g de nitrofenol por minuto, siendo el coeficiente de extinción molar 17.800 M cm⁻¹, medida a 405 nm. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

5.8. Visualización de la actividad proteasa alcalina mediante electroforesis SDS-PAGE.

La electroforesis se realizó de acuerdo con la metodología de Laemmli (1970). La electroforesis se realizó a un voltaje continuo de 100 V durante una hora a 4°C. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 11% con unas dimensiones de 8 x 10 x 0,075 cm. Estos geles se trataron según se describen Alarcón *et al.* (1998) para revelar la actividad proteasa de los extractos. Además, estos geles se lavaron con agua destilada, se les añadió una solución de caseína (0,75%) preparada en Tampón Tris-HCl 50 mM a pH 9, y se incubaron 30 min a 4°C. Entonces, se transfirieron a una solución fresca del mismo sustrato incubándose durante 90 min a 37°C. Por último, se retiró la solución de caseína, se lavaron los geles repetidas veces con agua destilada, y se fijaron con ácido tricloroacético (TCA) al 12% durante 10 min, antes de teñirlos con azul brillante (Coomassie Brilliant Blue R-250) en una solución con ácido acético glacial y metanol durante 12 horas. Para desteñir los geles se utilizó la misma solución que la citada anteriormente, sin colorante. Pasados unos minutos aparecían sobre el fondo azul una serie de bandas blancas que corresponden a las fracciones activas con actividad caseinolítica presente en los extractos.

5.9. Estudio ultraestructural de la mucosa intestinal.

Para realizar el barrido las muestras se fijaron en una solución de formaldehído 40 g L⁻¹ en PBS a pH 7,5 durante 24 horas. Posteriormente, se lavaron con PBS y fueron deshidratadas de manera progresiva, sometiéndolas a lavados sucesivos cada 20 minutos con un gradiente de concentraciones de etanol desde el 50% al 100% (v/v). Seguidamente, se desecaron las muestras sustituyendo el etanol absoluto por CO₂ líquido utilizando el desecador por punto crítico BAL-TEC CPD 030 Critical Point Dryer para eliminar a continuación el CO₂ líquido y traspasar las muestras a un desecador. Estas muestras desecadas se montaron en los soportes correspondientes y se fijaron con grafito (PELCO® Colloidal Graphite). Tras fijar y montar las muestras, estas se metalizaron con oro empleando la técnica de recubrimiento mediante pulverización catódica o método Sputtering utilizando el equipo BAL-TEC SCD 005 Cool Sputter Coater. La observación fue realizada con un microscopio electrónico de barrido HITACHI S-3500N en 10 kV.

Todas las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software Image J (versión 1.52) desarrollado por el National Institute of Health (USA), realizándose al menos 50 mediciones por tratamiento. A partir de las imágenes de SEM se evaluó la integridad de la mucosa intestinal mediante análisis visual y, en caso de proceder, se obtuvo información acerca del área apical de los enterocitos.

5.10. Análisis estadístico.

Los valores presentados en las tablas corresponden a la media \pm desviación estándar (sd) de al menos tres determinaciones. Los datos en porcentajes fueron normalizados mediante la raíz del arco seno de la observación de forma previa al análisis estadístico, que se realizó con el paquete estadístico Statgraphics Plus 4.0 para Windows (Rockville, Maryland, USA). En todos los casos se comprobó la normalidad y homogeneidad de la varianza. En el caso en que los datos no cumplieran una de esas dos premisas se procedió a transformarlos mediante el logaritmo neperiano o la raíz cuadrada de la variable, en función del menor valor del número de Barlettts. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de una vía en los datos con distribución paramétrica o Kruskal-Wallis en aquellas variables con distribución no paramétrica. En el caso de que las variables presentaran diferencias significativas entre los valores medios de los distintos tratamientos, estos últimos fueron analizados mediante test de comparación múltiple; i) test de Tukey para los datos paramétricos, o ii) mediante una gráfica de cajas y barras (Box and Whisker Plot) para los no paramétricos. Todos los análisis fueron realizados con un nivel de significación de 0,05.

6. RESULTADOS

6.1. Crecimiento y utilización de alimento.

La Figura 3 muestra la evolución del crecimiento (Figura 3A) y el peso final (Figura 3B) de los ejemplares juveniles de dorada. En general, tanto los peces alimentados con la dieta control (CT) como los alimentados con los piensos suplementados con probióticos y microalgas mostraron un crecimiento similar a lo largo del periodo estudiado, sin existir diferencias significativas en ninguno de los puntos de muestreo considerados. Tampoco se observaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento específico (SGR) y el aprovechamiento del alimento (FER) (Figura 4).

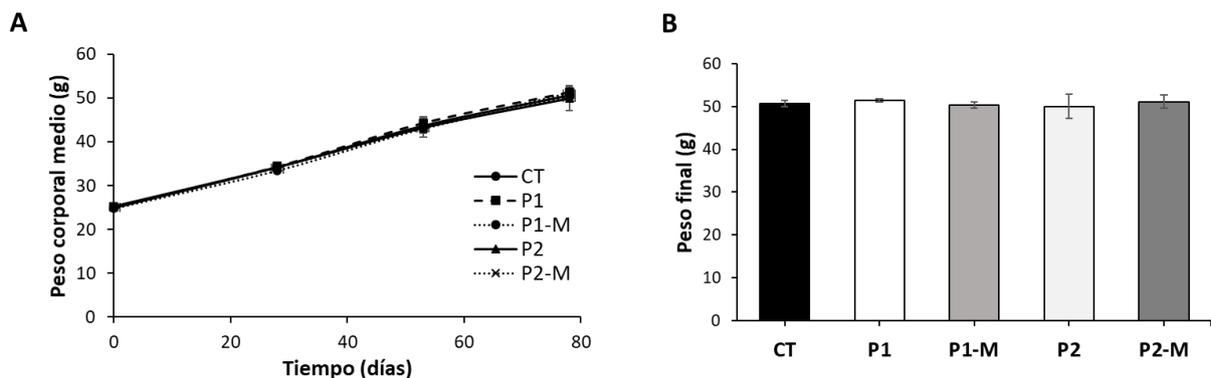


Figura 3. Evolución del crecimiento de los peces (A) y peso corporal a tiempo final (B) (peso fresco expresado en gramos) de los juveniles de dorada alimentados con las dietas experimentales. Códigos: CT: pienso control sin aditivos; P1: 10^9 ufc/kg del probiótico 1; P1-M: 10^9 ufc/kg del probiótico 1 + 5% microalgas hidrolizadas; P2: 10^9 ufc/kg del probiótico 2; P2-M: 10^9 ufc/kg del probiótico 2 + 5% microalgas hidrolizadas.

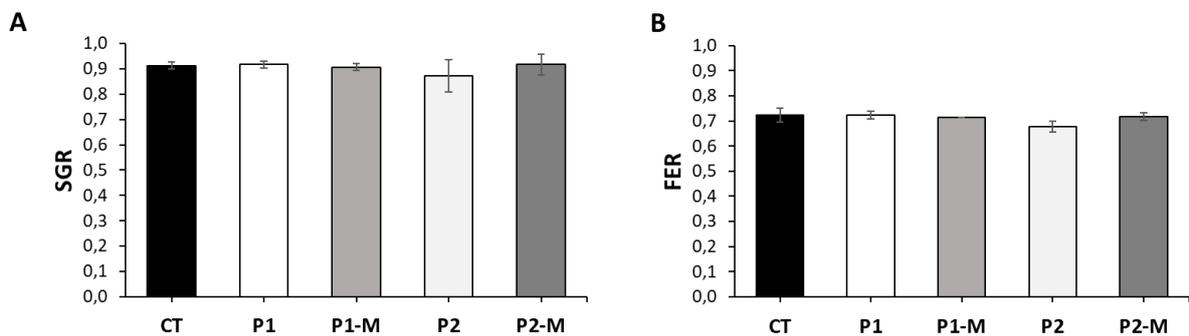


Figura 4. Tasa de crecimiento específico (A) y tasa de eficiencia alimentaria (B) de los juveniles de dorada al final del ensayo de alimentación. Códigos: CT: pienso control sin aditivos; P1: 10^9 ufc/kg del probiótico 1; P1-M: 10^9 ufc/kg del probiótico 1 + 5% microalgas hidrolizadas; P2: 10^9 ufc/kg del probiótico 2; P2-M: 10^9 ufc/kg del probiótico 2 + 5% microalgas hidrolizadas.

6.2. Composición proximal y perfil de ácidos grasos del músculo de dorada.

La Tabla 4 muestra la composición proximal del músculo de los ejemplares juveniles de dorada. En general, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados absteniéndose valores similares de en todos los tratamientos experimentales.

Por su parte, la Tabla 5 recoge el perfil de ácidos grasos del músculo de los juveniles de dorada al final del ensayo de alimentación. Los resultados obtenidos revelaron la ausencia de diferencias significativas atribuibles a la inclusión de los aditivos en la dieta ($p < 0,05$). El contenido total en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) fueron las fracciones predominantes alcanzando un contenido de entre un 37,18 y un 38,86% y un 36,32 y 38,81%, respectivamente, mientras que el contenido total en ácidos grasos saturados (SFA) fue de un 21,07 - 22,41%. Si se consideran de manera individual, los ácidos grasos predominantes fueron el ácido palmítico (C16:0) dentro de la fracción de SFA, con un contenido de entre un 15,00 y un 15,86%, el ácido oleico (C18:1n-9) entre los MUFA (entre un 29,15 y un 30,94%), linoleico (18:2n-6) y docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) entre los PUFA (13,35 - 14,63% y 11,93 - 13,34%, respectivamente). Tampoco se observaron diferencias significativas en las ratios n3/n6 y EPA/DHA, obteniéndose valores similares en todos los tratamientos evaluados.

Tabla 4. Composición proximal del músculo (g/100g de biomasa, MS) de los ejemplares al final del ensayo de alimentación.

	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Cenizas (%)	Humedad (%)
CT	69,93 ± 6,21	25,16 ± 0,06	5,47 ± 0,78	73,99 ± 0,407
P1	71,15 ± 0,87	23,56 ± 1,98	6,01 ± 0,52	74,00 ± 0,830
P1-M	71,56 ± 0,70	20,26 ± 0,31	5,29 ± 0,99	72,75 ± 0,582
P2	72,22 ± 0,96	18,16 ± 0,18	5,37 ± 0,63	73,40 ± 0,357
P2-M	71,23 ± 2,14	19,23 ± 0,36	5,61 ± 0,37	73,33 ± 0,673
p	<i>0,954</i>	<i>0,428</i>	<i>0,123</i>	<i>0,129</i>

Valores expresados como media ± SD (n=3). Los valores en la misma fila con distinta letra en minúscula indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). CT: pienso control; P1: pienso suplementado con probióticos; P1-M: pienso suplementado con probióticos y microalgas; P2: pienso suplementado con probióticos; P2-M: pienso suplementado con probióticos y microalgas.

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos (% total de ácidos grasos) del músculo de los ejemplares juveniles de dorada al final del ensayo de alimentación.

	CT	P1	P1-M	P2	P2-M	<i>p</i>
14:0	2,04 ± 0,02	2,13 ± 0,18	2,27 ± 0,07	2,08 ± 0,04	2,24 ± 0,11	0,261
16:0	15,21 ± 0,04	15,25 ± 0,70	15,86 ± 0,25	15,00 ± 1,49	15,86 ± 0,05	0,696
18:0	3,99 ± 0,19	4,03 ± 0,12	4,11 ± 0,03	4,00 ± 0,54	4,31 ± 0,11	0,745
16:1n-7	4,57 ± 0,27	4,55 ± 0,34	4,69 ± 0,12	4,41 ± 0,04	4,66 ± 0,19	0,746
18:1n-7	2,20 ± 0,08	2,21 ± 0,05	2,23 ± 0,07	2,26 ± 0,00	2,21 ± 0,08	0,480
18:1n-9	30,76 ± 1,66	30,94 ± 0,09	29,49 ± 0,05	29,86 ± 0,42	29,15 ± 0,74	0,487
20:1n-9	1,12 ± 0,00	1,15 ± 0,04	1,14 ± 0,04	1,12 ± 0,02	1,15 ± 0,07	0,929
18:2n-6	14,46 ± 0,24	14,63 ± 0,34	14,30 ± 0,16	13,35 ± 1,12	13,65 ± 0,17	0,232
18:3n-3	4,43 ± 0,12	4,64 ± 0,11	4,53 ± 0,04	4,10 ± 0,41	4,55 ± 0,10	0,231
16:3n-4	0,49 ± 0,03	0,47 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,46 ± 0,04	0,50 ± 0,03	0,465
18:4n-3	0,26 ± 0,00	0,26 ± 0,00	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,412
20:4n-6 (ARA)	1,03 ± 0,09	0,96 ± 0,02	1,03 ± 0,01	1,02 ± 0,09	1,01 ± 0,06	0,805
20:4n-3	0,41 ± 0,01 a	0,45 ± 0,03 ab	0,45 ± 0,02 ab	0,40 ± 0,01 a	0,49 ± 0,02 b	0,035
20:5n-3 (EPA)	3,67 ± 0,31	3,77 ± 0,13	4,01 ± 0,16	3,85 ± 0,03	3,99 ± 0,01	0,339
22:5n-3	1,33 ± 0,08	1,40 ± 0,05	1,46 ± 0,06	1,40 ± 0,05	1,54 ± 0,00	0,065
22:6n-3 (DHA)	12,99 ± 1,62	12,08 ± 0,95	12,55 ± 0,55	11,93 ± 0,80	13,34 ± 0,66	0,612
SFA	21,24 ± 0,20	21,41 ± 0,76	22,24 ± 0,29	21,07 ± 1,99	22,41 ± 0,05	0,578
MUFA	38,64 ± 2,01	38,86 ± 0,43	37,54 ± 0,18	37,65 ± 0,44	37,18 ± 1,08	0,511
PUFA	38,56 ± 1,75	38,19 ± 1,21	38,60 ± 0,49	36,32 ± 2,41	38,81 ± 1,02	0,531
Otros	3,04 ± 0,72	2,68 ± 0,08	2,59 ± 0,04	2,35 ± 0,18	3,30 ± 0,68	0,339
n-3	23,08 ± 1,90	22,60 ± 0,85	23,27 ± 0,34	21,96 ± 1,20	24,16 ± 0,78	0,475
n-6	15,48 ± 0,15	15,59 ± 0,36	15,33 ± 0,15	14,37 ± 1,21	14,65 ± 0,24	0,278
n-9	31,88 ± 1,66	32,09 ± 0,13	30,63 ± 0,01	30,98 ± 0,40	30,30 ± 0,81	0,483
n-3/n-6	1,49 ± 0,14	1,45 ± 0,02	1,52 ± 0,01	1,53 ± 0,05	1,65 ± 0,03	0,170
EPA/DHA	0,28 ± 0,01	0,31 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,508

Valores expresados como media ± SD (n=3). Los valores en la misma fila con distinta letra en minúscula indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

6.3. Oxidación lipídica.

La peroxidación lipídica se determinó en los filetes de dorada midiendo la concentración de productos secundarios a la oxidación, agrupados dentro de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando malonaldehído (MDA) como patrón. Los resultados obtenidos mostraron que la inclusión conjunta de las cepas probióticas y del hidrolizado de microalgas produce un incremento significativo ($p < 0,05$) de la respuesta antioxidante frente a los procesos de oxidación lipídica en el músculo. Los ejemplares alimentados con las dietas P1-M y P2-M mostraron valores (1,57 y 1,42 mg MDA kg⁻¹) significativamente inferiores a los observados en el grupo control (1,84 mg MDA kg⁻¹) (Figura 5).

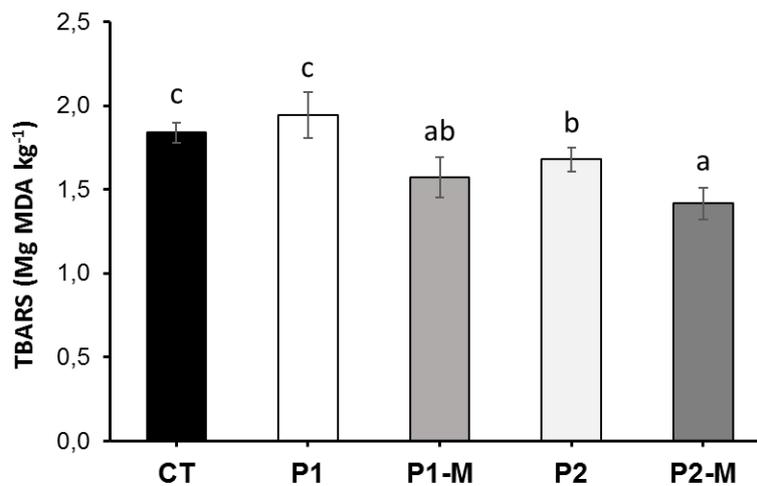


Figura 5. Efecto de administración conjunta de un hidrolizado de microalgas y microorganismos probióticos sobre el contenido en Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en el músculo de los ejemplares de dorada al final del ensayo de alimentación (media \pm SD, n=12). Códigos: CT: pienso control sin aditivos; P1: 10⁹ ufc/kg del probiótico 1; P1-M: 10⁹ ufc/kg del probiótico 1 + 5% microalgas hidrolizadas; P2: 10⁹ ufc/kg del probiótico 2; P2-M: 10⁹ ufc/kg del probiótico 2 + 5% microalgas hidrolizadas. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

6.4. Actividades enzimáticas digestivas.

En el análisis se han considerado dos grupos de enzimas diferentes: aquellas indicadoras de la capacidad digestiva como la proteasa alcalina total, tripsina y quimotripsina, y aquellas otras que pueden ser utilizadas como marcadores de la capacidad de absorción a nivel intestinal, como la fosfatasa alcalina y la aminopeptidasa. La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos para cada una de las actividades evaluadas.

En general, la inclusión de microorganismos probióticos y el hidrolizado de microalgas en los piensos no ejerció efectos negativos sobre ninguna de las actividades enzimáticas analizadas.

Se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en los niveles de actividad quimotripsina en los ejemplares alimentados con los piensos experimentales (P1, P1-M, P2 y P2-M) en comparación con los alimentados con la dieta CT. Además, se obtuvo un incremento significativo de los niveles de actividad proteasa alcalina en los peces alimentados con piensos suplementados con microorganismos probióticos P1 y P2, respecto a los valores observados en el grupo control (CT). En cuanto a las enzimas de secreción intestinal, la incorporación en el pienso de probióticos, solos o junto con el hidrolizado de microalgas, indujo un incremento en los niveles de actividad leucina aminopeptidasa ($p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron modificaciones para la actividad fosfatasa alcalina ($p > 0,05$).

Tabla 6. Actividades enzimáticas digestivas de los extractos obtenidos (U/g de tejido) en los extractos intestinales de juveniles de dorada al final del ensayo de alimentación.

	LAP	FAL	TRI ($\times 10^3$)	QUI	PAT
CT	0,15 \pm 0,04 a	8,40 \pm 1,60	78,79 \pm 15,32 a	1,22 \pm 0,25 a	431,54 \pm 95,83 a
P1	0,23 \pm 0,03 c	8,66 \pm 1,59	85,35 \pm 8,10 a	1,93 \pm 0,20 b	658,51 \pm 41,62 b
P1-M	0,23 \pm 0,03 bc	9,25 \pm 1,31	79,25 \pm 12,08 a	1,88 \pm 0,43 bc	537,63 \pm 61,51 ab
P2	0,19 \pm 0,05 bc	7,66 \pm 1,09	108,75 \pm 9,87 b	2,39 \pm 0,21 c	692,62 \pm 106,96 b
P2-M	0,19 \pm 0,02 ab	7,86 \pm 1,35	80,13 \pm 9,95 a	1,90 \pm 0,22 b	548,58 \pm 107,66 ab
<i>p</i>	<0,001	0,0609	<0,001	<0,001	<0,001

Valores expresados como media \pm SD (n=12). Los valores en la misma fila con distinta letra en minúscula indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). LAP: leucina aminopeptidasa; FAL: fosfatasa alcalina; TRI: tripsina; QUI: quimotripsina; PAT: proteasa alcalina total. Los valores en la misma columna con diferente letra minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Adicionalmente, el zimograma reveló que la inclusión del hidrolizado de probióticos y microalgas no alteró el patrón proteolítico intestinal en los juveniles de dorada (Figura 6). Los resultados indican que existe un mismo patrón de bandas activas en los peces de todos los tratamientos.

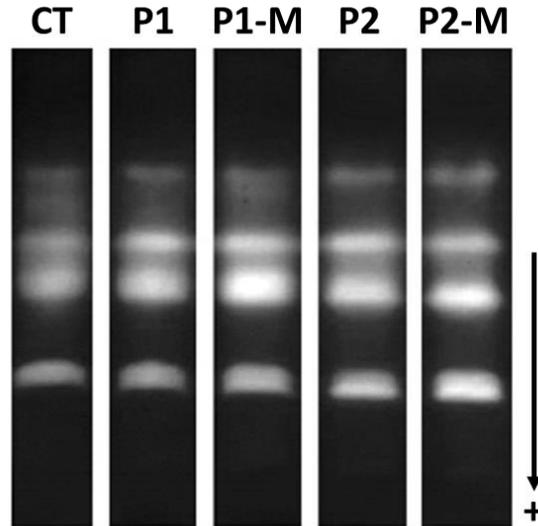


Figura 6. Substrato-SDS-PAGE de los extractos intestinales de los juveniles de *S. aurata* alimentados con piensos que incluyen probióticos y microalgas. Códigos: CT: pienso control sin aditivos; P1: 10^9 ufc/kg del probiótico 1; P1-M: 10^9 ufc/kg del probiótico 1 + 5% microalgas hidrolizadas; P2: 10^9 ufc/kg del probiótico 2; P2-M: 10^9 ufc/kg del probiótico 2 + 5% microalgas hidrolizadas.

6.5. Evaluación de la mucosa intestinal mediante microscopía electrónica de barrido.

El análisis visual de las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) confirmó la ausencia de daños o alteraciones en la integridad de la cara apical de los enterocitos (Figura 7). El análisis morfométrico de estas imágenes reveló que el área apical de los enterocitos es similar en todos los tratamientos ensayados sin observarse diferencias significativas entre los mismos (Figura 8).

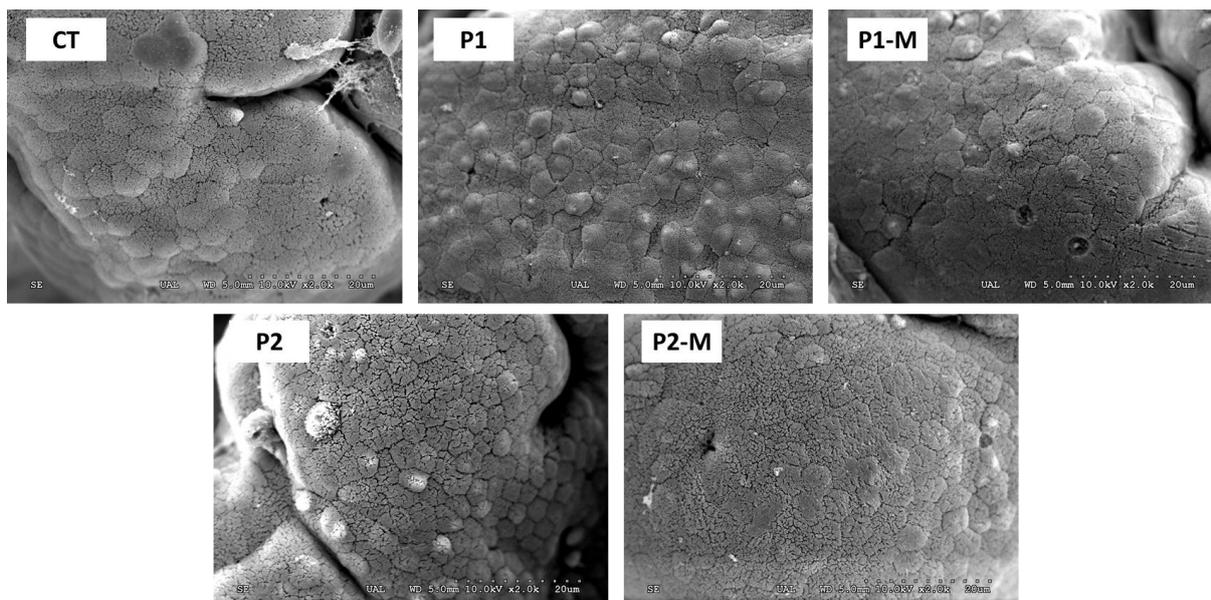


Figura 7. Detalle de la cara apical de los enterocitos del intestino de los juveniles de dorada alimentados con las dietas experimentales. Imágenes SEM (escala: 20µm). Códigos: CT: pienso control sin aditivos; P1: 10⁹ ufc/kg del probiótico 1; P1-M: 10⁹ ufc/kg del probiótico 1 + 5% microalgas hidrolizadas; P2: 10⁹ ufc/kg del probiótico 2; P2-M: 10⁹ ufc/kg del probiótico 2 + 5% microalgas hidrolizadas.

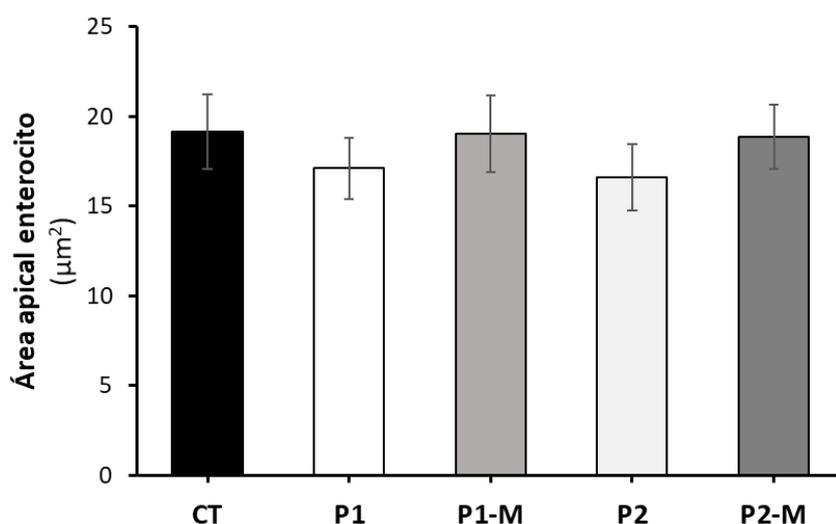


Figura 8. Área apical de los enterocitos de los ejemplares de dorada alimentados con las dietas experimentales. Códigos: CT: pienso control sin aditivos; P1: 10⁹ ufc/kg del probiótico 1; P1-M: 10⁹ ufc/kg del probiótico 1 + 5% microalgas hidrolizadas; P2: 10⁹ ufc/kg del probiótico 2; P2-M: 10⁹ ufc/kg del probiótico 2 + 5% microalgas hidrolizadas.

7. DISCUSIÓN

Durante los últimos años, numerosos autores han evaluado con éxito la incorporación en piensos para acuicultura tanto de microalgas (véase revisión de Shah *et al.*, 2018), como de microorganismos de probióticos (véase revisiones de Hai, 2015 y Ringø *et al.*, 2020). Sin embargo, son muy escasos los trabajos centrados en la evaluación de los posibles efectos sinérgicos derivados de la combinación de ambos aditivos (Cerezuela *et al.*, 2012; 2013). En el presente estudio, se alimentaron a ejemplares juveniles de dorada (*S. aurata*) con una dieta suplementada con dos microorganismos probióticos ácido lácticos aislados o en combinación con un hidrolizado de microalgas. Dados los posibles modos de acción complementarios de los probióticos y las microalgas, la administración conjunta en el pienso del hidrolizado de microalgas y los microorganismos probióticos podría constituir un preparado con potencial simbiótico proporcionando un efecto sinérgico y generando una respuesta mayor que con la administración de estos aditivos por separado.

Estudios previos han puesto de manifiesto mejoras tanto en la supervivencia como en las tasas de crecimiento y utilización de nutrientes derivadas de la incorporación de probióticos en piensos ya sea solos (Adel *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019), o como simbióticos junto con mananoligosacáridos, fructooligosacáridos, inulina, galactooligosacáridos e isomaltooligosacárido, entre otros (Huynh *et al.*, 2017). En la mayoría de estos trabajos, el incremento de estos parámetros se relaciona con el hecho de que los microorganismos probióticos pueden servir por sí mismos como fuente de nutrientes, vitaminas y enzimas digestivas, además de contribuir significativamente al consumo de alimento y la absorción de nutrientes. De hecho, se ha especulado que el consumo de probióticos mejora el apetito y aumenta la digestibilidad de los nutrientes estimulando la excreción de enzimas digestivas y manteniendo el equilibrio de la microbiota intestinal (Ringø *et al.*, 2020). En cuanto al empleo de microalgas, se ha observado que su inclusión en la dieta no ejerce efectos negativos en el crecimiento si bien estos están condicionados por distintos factores como la especie de alga y de pez utilizada, el tamaño de la microalga, el nivel de inclusión o su composición química, entre otros (Shah *et al.*, 2018). En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo revelaron que la incorporación aislada de probióticos, o junto al hidrolizado de microalgas no ejerció efectos negativos sobre el crecimiento y el aprovechamiento de nutrientes. En general, se observó una buena aceptación de todos los piensos, sin embargo, y a pesar de los buenos precedentes al respecto, no se observaron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros.

La composición proximal del músculo ofrece información acerca del contenido humedad, proteínas, lípidos y cenizas (Love, 1980), y a su vez, es considerado un indicador del estado fisiológico y de salud del pez (Saliu *et al.*, 2007). A pesar de que ninguna de las dietas ensayadas

modificó la composición proximal del músculo en este estudio, es conocido que tanto la inclusión de microorganismos probióticos como la de microalgas en piensos acuícolas pueden ejercer en algunos casos un efecto significativo en la composición química del animal. Autores como Pandey *et al.* (2021) observaron un incremento en el contenido en proteína en músculo en ejemplares de carpa común (*Cyprinus carpio*) alimentados con dietas suplementadas con *Lactobacillus plantarum* el cual parece estar asociado a la mejora en las tasas eficiencia alimentaria derivada de la incorporación de microorganismos probióticos en la dieta. Por su parte, autores como Roohani *et al.* (2019) y Galafat *et al.* (2020) señalaron que la presencia de determinados compuestos presentes en la biomasa de algunas especies de microalgas puede activar el metabolismo de los peces y, en particular, el uso de lípidos como fuente de energía, lo que conduce a una reducción del almacenamiento de tejidos.

Por su parte, la evaluación del perfil de ácidos grasos ofrece información relevante relacionada con la influencia del pienso en el animal (Fernandes *et al.*, 2012). De hecho, los cambios en la composición de ácidos grasos de la dieta pueden verse reflejados en el perfil de ácidos grasos de los peces marinos (Fountoulaki *et al.*, 2009). En este trabajo, todas las dietas experimentales presentaron un contenido similar en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales desempeñan importantes funciones fisiológicas en el animal (Emery *et al.*, 2016). El ácido araquidónico (ARA, C20:4n-6), eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3) y docosahexaenoico (DHA, C22:6n-3) juegan un papel importante en la estructura y función de la membrana celular y un aporte insuficiente está relacionado con reducciones en el crecimiento y un mayor índice de mortalidad, así como con otras patologías como hígado graso o la esteatosis intestinal (Tocher *et al.*, 2010). En este caso, la inclusión de ambos aditivos en el pienso no modificó el perfil de ácidos grasos del músculo el cual reflejó el observado en las dietas experimentales, lo que contrasta con lo observado en trabajos anteriores en los que la inclusión de biomasa de algunas especies de microalgas como *Arthrospira platensis*, *Thysochrysis lutea* o *Nannochloropsis gaditana* parece ser responsable de un cierto grado de retención selectiva de ciertos ácidos grasos poliinsaturados como el ARA (20:5n-3) y el DHA (22:6n-3) en músculo e hígado (Vizcaíno *et al.*, 2018; García-Márquez *et al.*, 2020).

Por otro lado, los aditivos microbianos han mostrado efectos prometedores en cuanto a sus efectos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes (Guardiola *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos en el presente estudio revelaron que todos los grupos experimentales excepto los alimentados con la dieta suplementada con el microorganismo probiótico P-326 (P-1), mostraron una reducción significativa del contenido de MDA en músculo respecto a lo observado en los peces alimentados con el pienso sin aditivos, lo que está directamente relacionado con una mayor captación de especies reactivas de oxígeno, que resulta en una menor oxidación de los lípidos musculares (Teimouri *et al.*, 2019). Cabe destacar que este fenómeno fue especialmente notable en los peces alimentados con las dietas suplementadas

con probióticos y microalgas (P1-M) y (P2-M). Es conocido que la inclusión microalgas induce una mejora el estado oxidativo del músculo debido principalmente a su contenido en pigmentos, compuestos fenólicos y vitaminas de los grupos C y E (Sáez *et al.*, 2021). Algunas especies como las pertenecientes al género *Arthrospira* sp. presentan una amplia gama de compuestos bioactivos, como las xantofilas que juegan un papel clave en la inhibición de la peroxidación lipídica (Deng y Chow, 2010; Kim *et al.*, 2013). De hecho, las xantofilas tienen una potente capacidad antioxidante contra las especies reactivas del oxígeno (Hallerud, 2014) lo que podría explicar la mayor reducción de la peroxidación lipídica de los lípidos musculares de los ejemplares alimentados con las dietas que contienen el hidrolizado de microalgas.

Como se ha comentado anteriormente, uno de los principales efectos de la administración de probióticos como aditivo en piensos para acuicultura es la mejora en la eficiencia alimentaria de los peces. Es sabido que un adecuado crecimiento está estrechamente relacionado con la capacidad fisiológica de los peces para digerir y transformar los nutrientes ingeridos (Vizcaíno *et al.*, 2018) por lo que su correcto funcionamiento es crucial para el óptimo desarrollo del animal (Sweetman *et al.*, 2008). En este sentido, la evaluación de los niveles de actividad de las distintas enzimas digestivas y el conocimiento de su implicación en los procesos de digestión y absorción son herramientas clave para conocer el estado del animal, así como para la selección de nuevos ingredientes para su uso en acuicultura (Alarcón *et al.*, 1998). Estudios previos han demostrado que la utilización tanto de microorganismos probióticos como de microalgas induce cambios significativos en algunas de las enzimas involucradas en los procesos de digestión y absorción a nivel intestinal, observándose un incremento en los niveles de actividad de enzimas de secreción pancreática como la proteasa alcalina total, tripsina y quimotripsina y de secreción intestinal como la fosfatasa alcalina (Ringø *et al.*, 2020; Vizcaíno *et al.*, 2014). En concordancia con estos trabajos, los resultados obtenidos en el presente estudio revelaron que la incorporación aislada de probióticos, o junto al hidrolizado de microalgas no indujo ningún efecto negativo sobre las actividades enzimáticas analizadas, si bien se observaron incrementos significativos en los niveles de actividad de algunas de ellas respecto al grupo control. Se observó un incremento significativo en los niveles actividad quimotripsina en los peces alimentados con los piensos suplementados con probióticos y microalgas, así como un aumento en los niveles de actividad proteasa alcalina total en los ejemplares alimentados con los piensos suplementados con probióticos (P1 y P2). Resultados similares fueron encontrados por Mohammadian *et al.* (2019) quienes registraron un incremento en los niveles de actividad proteasa alcalina en ejemplares de carpa común (*Cyprinus carpio*) alimentados con piensos suplementados con 5×10^7 ufc/kg, o Dehaghani *et al.* (2015) quienes revelaron un incremento en los niveles de actividad quimotripsina derivado de la inclusión en pienso de un simbiótico constituido por *Enterococcus faecium* y fructooligosacáridos. En lo que respecta a las enzimas de secreción intestinal, la incorporación

aislada de probióticos, o junto al hidrolizado de microalgas, indujo un incremento en los niveles de actividad leucina aminopeptidasa. Las enzimas del ribete en cepillo son utilizadas como indicadores de la integridad intestinal (Wahnon *et al.*, 1992) y la absorción de nutrientes (Silva *et al.*, 2010) ya que desempeñan un papel clave en las etapas finales de digestión, permitiendo la absorción y transporte de nutrientes a través de los enterocitos (Infante y Cahu, 2001). Este incremento en los niveles de actividad enzimática parece explicar los efectos positivos sobre la tasa de crecimiento y de utilización del alimento derivados de la inclusión de probióticos y simbióticos en el alimento (véase revisión de Ringø *et al.*, 2020). Una mayor secreción de enzimas digestivas induce una mejora en la digestión de la proteína que a su vez contribuye a una mejor utilización del pienso. Sin embargo, en el presente estudio, el incremento en los niveles de actividad proteasa alcalina, quimotripsina y leucina aminopeptidasa no se vio reflejado en una mejora de la tasa de crecimiento y aprovechamiento del alimento.

Además de esto, es importante tener en cuenta que el intestino es un sistema complejo que juega un papel fundamental no solo en los procesos de digestión y absorción de nutrientes, sino también como barrera física frente a patógenos, por lo que mantener su estabilidad e integridad es fundamental para una adecuada nutrición y, por consiguiente, crecimiento de los peces (Cerezuela *et al.*, 2012). En este sentido, numerosos estudios han puesto de manifiesto que la inclusión de probióticos y microalgas en piensos ejercen un efecto significativo sobre la morfología e integridad de la mucosa intestinal, observándose en general, efectos positivos derivados de su administración. Así, autores como Pirarat *et al.* (2011) mostraron que la inclusión de *Lactobacillus rhamnosus* en la dieta indujo a un aumento significativo en la altura de las vellosidades en ejemplares de tilapia (*Oreochromis niloticus*), incluso se ha visto que la inclusión de *Pediococcus acidilactici* puede mejorar las microvellosidades intestinales en ejemplares de esta misma especie (Merrifield *et al.*, 2010). Por su parte, la inclusión de distintas especies de microalgas también se ha demostrado que está relacionada con un incremento en la superficie de absorción de los enterocitos en ejemplares de dorada (*S. aurata*) y lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) (Vizcaíno *et al.*, 2014; 2018). En el caso de este trabajo, no se observaron señales de daño o inflamación en la superficie apical de los enterocitos, si bien el área apical de los enterocitos fue similar en todos los tratamientos ensayados.

A la luz de los resultados obtenidos, la utilización de simbióticos constituidos por microorganismos probióticos y microalgas hidrolizadas no ejerció efectos negativos sobre el crecimiento y aprovechamiento nutritivos de los ejemplares juveniles de dorada. Resulta evidente que su incorporación en pienso ejerce incremento significativo de la respuesta antioxidante frente a los procesos de oxidación lipídica en el músculo, así como una mejora en los niveles de actividad enzimática digestiva en los ejemplares juveniles de dorada y esto

representa una mejora en la capacidad de digestión y absorción de nutrientes a nivel intestinal.

8. CONCLUSIONES

1. La incorporación aislada de probióticos ácidos-lácticos, o junto al hidrolizado de microalgas en piensos para juveniles de dorada no ejerce efectos negativos en el crecimiento y el estado de condición general de los peces.
2. Los resultados obtenidos tras el ensayo de alimentación confirman que la administración en pienso de microorganismos probióticos y microalgas no modifica la composición proximal ni el perfil de ácidos grasos del músculo, si bien su administración conjunta induce un incremento de la respuesta antioxidante frente a los procesos de oxidación lipídica.
3. La utilización de microorganismos probióticos y microalgas hidrolizadas como aditivo en pienso ejerce una mejora significativa en los niveles de actividad enzimática digestiva en los ejemplares juveniles de dorada, y esto representa una mejora en la capacidad de digestión y absorción de nutrientes a nivel intestinal.
4. Como conclusión final, los resultados obtenidos confirman el potencial de los simbióticos constituidos por microorganismos probióticos y microalgas hidrolizadas para su utilización como una estrategia para mejorar la nutrición de los animales, su estado fisiológico y de salud, y posibilitar una producción acuícola sostenible, si bien se sugiere la realización nuevos estudios para profundizar en otros aspectos relacionados con el metabolismo intermedio, sistema inmune y estado de la mucosa intestinal.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adel, M., Caipang, C.M.A. & Dawood, M.A. (2017). Immunological responses and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles following dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*). *Fish & Shellfish Immunology*, 71, 230-238.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A.M. & Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. *Fish & shellfish immunology*, 45(2), 733-741.
- Alarcón, F.J., Díaz, M., Moyano, F.J., & 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.
- AOAC, (2000) Official methods of analysis. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. *Methods* 925.10, 65.17, 974.24, 992.16.
- APROMAR, (2019). La acuicultura en España 2019. Recuperado de <http://www.apromar.es/content/informes-anales>
- APROMAR, (2020). La acuicultura en España 2020. Recuperado de <http://www.apromar.es/content/informes-anales>
- Becker, E.W. (2007). Microalgas como fuente de proteínas. *Avances en biotecnología*, 25(2), 207-210.
- Bergmeyer, H.V. (1974). Phosphatases Methods of Enzymatic Analysis, vol. 2. Academic Press, New York.
- Bharathi, S., Antony, C., Cbt, R., Arumugam, U., Ahilan, B. & Aanand, S. (2019). Functional feed additives used in fish feeds. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 7(3), 44-52.
- Brown, M.R. (2002). Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *Avances en Nutrición Acuicola*, 3, 281-292.
- Buege, J.A. & de Aust, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302-310.
- Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S.T., Meseguer, J., Moriñigo, M.Á. & Esteban, M.A. (2012). Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. *Cell and tissue research*, 350(3), 477-489.
- Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S.T., Meseguer, J., Moriñigo, M.A. & Esteban, M.A. (2013). Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish & shellfish immunology*, 34(5), 1063-1070.

- Chalamaiah M., Dinesh B.K., Hemalatha R. & Jyothirmayi T. (2012). Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chemistry*, 135(4), 3020-3038.
- Collins, M.D. & Gibson, G.R. (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 1052-1057.
- Dawood, M.A., Abo-Al-Ela, H.G. & Hasan, M.T. (2020). Modulation of transcriptomic profile in aquatic animals: Probiotics, prebiotics and synbiotics scenarios. *Fish & shellfish immunology*, 97, 268-282.
- Dawood, M.A., Koshio, S. & Esteban, M.A. (2018). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 950-974.
- de Cruz, C.R., Lubrano, A., & Gatlin III, D.M. (2018). Evaluation of microalgae concentrates as partial fishmeal replacements for hybrid striped bass *Morone sp.* *Aquaculture*, 493, 130-136.
- De la Higuera, M. & Cardenete, G. (1993). La proteína en la nutrición de los peces. En: Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción (Ed.) Castello Orvay F. Universidad de Barcelona, Barcelona, España, pp. 195-226.
- Dehaghani, P.G., Baboli, M.J., Moghadam, A.T., Ziaei-Nejad, S. & Pourfarhadi, M. (2015). Effect of synbiotic dietary supplementation on survival, growth performance, and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Czech Journal of Animal Science*, 60(5), 224-232.
- DelMar, E.G., Largman, C., Broderick, J.W., & Geokas, M.C. (1979). A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Analytical Biochemistry*, 99, 316-320.
- Deng R. & Chow T.J. (2010). Hypolipidemic, antioxidant and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics*, 28(4), 33-45.
- Duarte Pesantes, B. P. & Marcillo Morla, F. (2007). *Caracterización y propuesta técnica de la acuicultura en la zona de engabao, provincia del Guayas* (Bachelor's thesis).
- Emery, J.A., Norambuena, F., Trushenski, J., & Turchini, G.M. (2016). Uncoupling EPA and DHA in fish nutrition: dietary demand is limited in Atlantic salmon and effectively met by DHA alone. *Lipids*, 51(4), 399-412.
- Erlanger, B., Kokowsky, N. & Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 95(2), 271-278.
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome.
- Fernandes, T.J.R., Alves, R.C., Souza, T., Silva, J.M.G., Castro-Cunha, M., Valente L.M.P. & Oliveira M.B.P.P. (2012). Lipid content and fatty acid profile of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup,

- 1858) juveniles as affected by feed containing different amounts of plant protein sources. *Food Chemistry*, 134(3), 1337-1342.
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.
- Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Hurtado, R., Grigorakis, K., Karacostas, I., Nengas, I., Rigos, G., Kotzamanis, Y., Venou, B. & Alexis, M.N. (2009) Fish oil substitution by vegetable oils in commercial diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.); effects on growth performance, flesh quality and fillet fatty acid profile: recovery of fatty acid profiles by a fish oil finishing diet under fluctuating water temperatures. *Aquaculture*, 289, 317-326.
- Gabriela, O., Carolina, G., Verónica, I., Josefina, M. & Silvia, B. (2007). Alimentos funcionales: conceptos, definiciones y marco legal global. *Diaeta (B. Aires)*, 25(119), 33-41.
- Galafat, A., Vizcaíno, A.J., Sáez, M.I., Martínez, T.F., Jérez-Cepa, I., Mancera, J.M., & Alarcón, F.J. (2020). Evaluation of *Arthrospira* sp. Enzyme Hydrolysate as Dietary Additive in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Juveniles. *Journal of Applied Phycology* 32(5), 3089-3100.
- García-Márquez, J., Rico, R.M., Sánchez-Saavedra, M.D.P., Gómez-Pinchetti, J.L., Ación, F.G., Figueroa, F.L., Alarcón, F.J., Moriñigo, M.A. & Abdala-Díaz, R.T. (2020). A short pulse of dietary algae boosts immune response and modulates fatty acid composition in juvenile *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research*, 51(11), 4397-4409.
- Gong, Y., Bandara, T., Huntley, M., Johnson, Z.I., Dias, J., Dahle, D., Sorensen, 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.
- Guardiola, F.A., Bahi, A., Messina, C.M., Mahdhi, A., Santulli, A., Arena, R.C., Bakhrouf, A. & Esteban, M.A. (2017). Quality and antioxidant response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) to dietary supplements of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) alone or combined with probiotic strains. *Fish & shellfish immunology*, 63, 277-284.
- Gupta, S., Gupta, C., Garg, A.P. & Prakash, D. (2017). Prebiotic efficiency of blue green algae on probiotics microorganisms. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 4(4), 00120.
- Hai, N.V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of applied microbiology*, 119(4), 917-935.
- Hallerud, C. (2014). Pigment composition of macroalgae from a Norwegian Kelp forest, (PhD Thesis, Institutt for biologi).
- Huynh, T.G., Shiu, Y.L., Nguyen, T.P., Truong, Q.P., Chen, J.C. & Liu, C.H. (2017). Current applications, selection, and possible mechanisms of actions of synbiotics in improving the growth and health status in aquaculture: a review. *Fish & Shellfish Immunology*, 64, 367-382.

- Infante, J.Z. & Cahu, C.L. (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(4), 477-487.
- Kim, S.S., Rahimnejad, S., Kim, K.W. & Lee, K.J. (2013). Partial replacement of fish meal with *Spirulina pacifica* in diets for parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13(2).
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680.
- Lepage, G.Y. & Roy, C.C. (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research*, 25(12), 1391-1396.
- 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.
- Love, R.M. (1980). *The Chemical Biology of Fishes*, Vol 2. London, United Kingdom: Academic Press.
- Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M. & Davies, S.J. (2010). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquaculture nutrition*, 16(5), 496-503.
- 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, immune-hematological parameters and immune-related gene expression in common carp, *Cyprinus carpio*: An experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 511, 634197.
- Msangi, S., Kobayashi, M., Batka, M., Vannuccini, S., Dey, M.M. & Anderson, J.L. (2013). Fish to 2030: prospects for fisheries and aquaculture. *World Bank Report*, 83177(1), 102.
- Naylor, R., Goldburg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H. & Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405: 1017-1024.
- Pandey, A., Khairnar, S.O. & Tyagi, A. (2021). Effect of dietary supplementation of probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum*) on growth and proximate composition of *Cyprinus carpio* Fingerlings. *National Academy Science Letters*, 1-8.
- Percival, E.E. & Turvey, J.R. (1974). Polysaccharides of algae. CRC, handbook of microbiology, condensed edition, 532nd ed, ed. AL Laskin, and HA Lechevalier. Cleveland: CRC Press Inc.
- Pereira, T.G. & Oliva-Teles, A. (2003). Evaluation of corn gluten meal as a protein source in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquaculture Research*, 34, 1111-1117.

- Pfeiderer, G. (1970). Particle-bound aminopeptidase from pig kidney. *Methods in Enzymology*, 19, 514-521.
- Pirarat, N., Pinpimai, K., Endo, M., Katagiri, T., Ponpornpisit, A., Chansue, N. & Maita, M. (2011). Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Research in veterinary science*, 91(3), 92-97.
- Ringø, E., Van Doan, H., Lee, S. H., Soltani, M., Hoseinifar, S.H., Harikrishnan, R. & Song, S.K. (2020). Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *Journal of applied microbiology*, 129(1), 116-136.
- Rodríguez-Ruiz J., Belarbi E.H., García J.L. & López D. (1998). Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. *Biotechnology techniques*, 12(9), 689-691.
- Roohani, A.M., Kenari, A.A., Kapoorchali, M.F., Borani, M.S., Zorriehzahra, M.J., Smiley, A.H., Esmaili, M. & Rombenso, A.N. (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.
- Sáez, M.I., Suárez, M.D., Alarcón, F.J. & Martínez, T.F. (2021). Assessing the potential of algae extracts for extending the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *Foods*, 10(5), 910.
- Saliu, J.K., Joy, O. & Catherine, O. (2007). Condition factor, fat and protein content of five fish species in Lekki Lagoon, Nigeria. *Life Science Journal*, 4(2), 54-57.
- Sánchez-Lozano, N., Vidal, A.T., Martínez-Llorens, S., Nogales-Mérida, S., Espert-Blanco, J., Monino-López, A., Pla-Torres, M. & Jover-Cerda, M. (2007). Growth and economic profit of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed sunflower meal. *Aquaculture*, 272(1-4), 528-534.
- Sánchez-Lozano, N., Vidal, A.T., Martínez-Llorens, S., Nogales-Mérida, S., Espert-Blanco, J., Moñino-López, A., Pla-Torres, M. & Jover-Cerdá, M. (2007) Growth and economic profit of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed sunflower meal. *Aquaculture*, 272: 528-534.
- Senni, K., Pereira, J., Gueniche, F., Delbarre-Ladrat, C., Sinquin, C., Ratiskol, J., Godeau, G., Fischer, A.M., Helley, D. & Colliet-Jouault, S. (2011). Marine polysaccharides: a source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. *Marine drugs*, 9(9), 1664-1681.
- Shah, M.R., Lutz, G.A., Alam, A., Sarker, P., Chowdhury, M.K., Parsaeimehr, A., Liang, Y. & Daroch, M. (2018). Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 197-213.
- Silva, F.C.P., Nicoli, J.R., Zambonino-Infante, J.L., Le Gall, M., Kaushik, S. & Gatesoupe, F.J. (2010). Influence of partial substitution of dietary fishmeal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream, *Sparus aurata* and goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 306(1-4), 233-237.

- Sorroza, L., Padilla-Castillo, D., Acosta Arbelo, F., Román, L., Acosta-Hernández, B., & Real Valcárcel, F. (2009). Uso de probióticos en Acuicultura. *Revista canaria de las ciencias veterinarias*.
- Sweetman, J., Dimitroglou, A., Davies, S.J. & Torrecillas, S. (2008). Gut morphology: a key to efficient nutrition. *International Aquafeed*, 11, 26-30.
- Tchorbanov, B. & Bozhkova, M. (1988). Enzymatic hydrolysis of cell proteins in green algae *Chlorella* and *Scenedesmus* after extraction with organic solvents. *Enzyme and microbial technology*, 10(4), 233-238.
- Teimouri, M., Yeganeh, S., Mianji, G.R., Najafi, M. & Mahjoub, S. (2019). The effect of *Spirulina platensis* meal on antioxidant gene expression, total antioxidant capacity, and lipid peroxidation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 45(3), 977-986.
- Tibaldi E., Chini Zittelli G.C., Parisi G., Bruno M., Giorgi G., Tulli F., Venturini S., Tredici M.R. & Poli B.M. (2015). Growth performance and quality traits of European sea bass (*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.
- Tocher, D.R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture research*, 41(5), 717-732.
- Vizcaíno, A.J., López, G., Sáez, M.I., Jiménez, J.A., Barros, A., Hidalgo, L., Camacho-Rodríguez, J., Martínez, T.F., Cerón-García, M.C. & Alarcón, F.J. (2014). Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture*, 431, 34-43.
- Vizcaíno, A.J., Rodiles, A., López, G., Sáez, M.I., Herrera, M., Hachero, I., Martínez, T.F., Cerón-García, M.C. & Alarcón, F.J. (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.
- Vizcaíno, A.J., Saéz, M.I., López, G., Arizcun, M., Abellán, E., Martínez, T.F., Cerón-García, M.C. & Alarcón, F.J. (2016). *Tetraselmis suecica* and *Tisochrysis lutea* meal as dietary ingredients for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fry. *Journal of Applied Physiology*, 28, 2843-2855.
- Wahnon, R., Cogan, U. & Mokady, S. (1992). Dietary fish oil modulates the alkaline phosphatase activity and not the fluidity of rat intestinal microvillus membrane. *The Journal of nutrition*, 122(5), 1077-1084.
- Wang, A., Ran, C., Wang, Y., Zhang, Z., Ding, Q., Yang, Y., Olsen, R.E., Ringø, E., Bindelle, J. y Zhou, Z. (2019). Use of probiotics in aquaculture of China—a review of the past decade. *Fish & shellfish immunology*, 86, 734-755.
- Yadav, M.K., Khati, A., Chauhan, R.S., Arya, P. & Semwal, A. (2021). A review on feed additives used in fish diet. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 6, 2.

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.