



REVISIONES EN NUTRICIÓN DE ORGANISMOS ACUÁTICOS

Editores: Lucía Elizabeth Cruz
Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya
Tapia Salazar, Martha Guadalupe
Nieto López, David A. Villarreal
Cavazos, Julián Gamboa Delgado,
Martha Gabriela Gaxiola Cortés y
Miguel Ángel Olvera Novoa.

Revisiones en Nutrición de Organismos Acuáticos
2019, Monterrey, Nuevo León, México

Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, Martha Gabriela Gaxiola Cortés y Miguel Ángel Olvera Novoa

Programa Maricultura
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León 2019

Copias disponibles en:
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa Maricultura
Cd. Universitaria A.P. F-67
San Nicolás de los Garza, Nuevo León
C.P. 66455
Tel.+Fax. 818352 6380
E-mail: lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

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

Autores del escrito. 2019. Nombre del artículo. Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, Martha Gabriela Gaxiola Cortés y Miguel Ángel Olvera Novoa. Revisiones en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. ISBN: 978-607-27-1268-3. El cuidado de la presente edición, así como su realización estuvo a cargo de los editores.

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

Los editores hacemos extensivo nuestro profundo agradecimiento:

- A las personas que colaboraron en la edición técnica de estas memorias
- Y a la imprenta Universitaria de la UANL por el apoyo brindado para la impresión de estas memorias.

Directorio

Mtro. Rogelio Garza Rivera
Rector

Dr. Santos Guzmán López
Secretario. General

Dr. Celso José Garza Acuña
Secretario extensión y cultura

Lic. Antonio Ramos Revillas
Director de publicaciones

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

Editores

Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, Martha Gabriela Gaxiola Cortés y Miguel Ángel Olvera Novoa

Dirección de edición: Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Av. Universidad S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66455

Email: elicruz@hotmail.com, lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

Teléfonos: 52 8183526380

Primera edición 2019. ©Universidad Autónoma de Nuevo León. ©L. Elizabeth Cruz Suárez, ©Denis Ricque Marie, ©Mireya Tapia Salazar, ©Martha Guadalupe Nieto López, ©David Alonso Villarreal Cavazos, ©Julián Gamboa Delgado© Martha Gabriela Gaxiola Cortés y ©Miguel Ángel Olvera Novoa.

ISBN: 978-607-27-1268-3. El cuidado y edición estuvo a cargo de los editores.

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

Proyecto realizado con financiamiento de la Secretaría de Educación Pública-Subsecretaría de Educación Superior-Dirección General de Educación Superior Universitaria". No. Convenio: 0698/19

Índice

Rocío Guerrero Zarate*, Carlos A. Álvarez-Gonzalez, Ronald Jesús-Contreras, Raúl Llera-Herrera, Otilio Méndez Marín, Mario A. Galaviz, Lus M. López Uso de carbohidratos en alimentos para pejelagarto (<i>Atractosteus tropicus</i>) y su efecto en el metabolismo intermediario Use of carbohydrates in foods for pejelagarto (<i>Atractosteus tropicus</i>) and its effect on intermediary metabolism	1
Uriel Rodríguez Estrada*, Carlos A. Álvarez González, Emyr Peña-Marín, Susana Camarillo-Coop, Rafael Martínez García Avances en la investigación a nivel mundial en alimentos alternativos basados en proteínas para la cobia (<i>Rachycentron canadum</i>) Worldwide Research Advances in Alternate Protein-Based Feedstuffs for Cobia (<i>Rachycentron canadum</i>)	38
Diana Cristina Corral Rosales*, Elena Palacios, Denis Ricque, L.Elizabeth Cruz Suárez Efectos de la inclusión dietaria de <i>Ulva clathrata</i> sobre el desempeño reproductivo y la calidad del desove en camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> (BOONE, 1931) en condiciones de producción comercial Effects of the dietary inclusion of <i>Ulva clathrata</i> on reproductive performance and spawning quality in white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> (BOONE, 1931) under commercial production conditions	72
Tsai García Galano*, Olimpia Carrillo, Laida Ramos y Gabriela Gaxiola Efecto de la vitamina C en los camarones peneidos: estado actual del conocimiento Vitamin C and his effect on shrimp: current stage of knowledge	106
Martín Arenas*, Álvaro Barreto y Gabriela Gaxiola Estado actual del desarrollo acuícola, la alimentación y la nutrición de los Centropómidos Current status of aquaculture development, food and nutrition of Centropomids	132
Adriana Ferreira Da Silva*, Adriana Carolina Carrillo P at, Juan Carlos Maldonado Flores, Magnolia Tzec Gamboa, Francisco J. Solorio Sánchez Enfoque sustentable en la engorda de tilapia del Nilo alimentadas con harina de biofloc: una revisión Sustainable approach of grow Nile tilapia fed with biofloc meal: a review	150
Maribel Maldonado-Muñiz, Nieto-López Martha Guadalupe, Lucia Elizabeth Cruz-Suárez Nanopartículas de Plata como Aditivo en Alimentos para Control de Enfermedades Causadas por <i>Vibrio</i> en <i>L. vannamei</i>	168

Samuel López-Tejeida*, Juan Fernando García Trejo, Leticia Félix Cuencas y Maribel Villegas-Villegas Variación del metabolismo de los peces debido al alimento en sistemas acuícolas Variation of fish metabolism due to food in aquaculture systems	200
Elena Palacios Mechetnov Ácido araquidónico en organismos de acuicultura silvestres y cultivados y su relación con el estrés Arachidonic acid in wild and culture organisms in relation to stress	220
Oscar Monroig Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en invertebrados acuáticos: aplicaciones en nutrición acuícola Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in aquatic invertebrates: Applications in aquaculture nutrition	249
Gabriela Gaxiola, M. Emerenciano, A. Abelaez, E. Magaña-Gallegos, D. Aguilera, M. Valenzuela, M. Arévalo, C. Maldonado y Gerard Cuzon* Valor nutrimental del biofloc, evolución del concepto durante 40 años Nutritional value of Floc, evolution of concept over 40 years	271
Silvio Peixoto*, Roberta Soares, Jose Filipe da Silva, Santiago Hamilton, Joao Reis and Allen Davis La acústica como herramienta para monitorear la actividad de alimentación de camarones Acoustic as a tool to monitor shrimp feeding activity	287
Luis Héctor Hernández Hernández Concentrados de proteína vegetal en el crecimiento y respuesta inflamatoria en trucha arcoíris Plant protein concentrates on growth and inflammatory response in rainbow trout	296
Josafat Marina Ezquerro Brauer Subproductos de calamar en acuicultura: estudios químico estructurales Squid byproducts in aquaculture: studies of chemical structure	310
Martha Elisa Rivas Vega*, Anselmo Miranda-Baeza, Pablo Sergio Osuna-Amarillas y Mario Nieves-Soto Avances en el uso de macroalgas marinas colectadas en Sonora, México, para el control de enfermedades virales y bacterianas en camarón Advances in the use of marine macroalgae collected in Sonora, México, for the control of viral and bacterial diseases in shrimp	333
Felipe do Nascimento Vieira, Esmeralda Chamorro Legarda*, Claudia Machado, Walter Quadros Seiffert Cultivos multitróficos con la tecnología de biofloc: incrementando la eficiencia del uso de los nutrientes de la dieta	348

Multitrophic culture with Biofloc Technology: Increasing the Efficiency of the Use of Diet Nutrients	
Rebeca Martínez Rodríguez*, Antonio Morales, Yamila Carpio, Liz Hernandez, Fidel Herrera, Osmany Gonzalez, Nestor Exposito, Lincidio Pérez, Philippe Mahl, Pierre Henning, Enrique Pérez, Alina Rodríguez, Mario Pablo Estrada Suplementos nutricionales para peces y crustáceos. Acuabio V, Caso Específico, Resultados en Laboratorio y Ensayo de Campo Nutritional Supplements to Finfish and Crustaceans. Acuabio V, Specific Case, Results in Laboratory and Field Trial	363
Amilcar Arenal Cruz*, Adrian Toledo, Yailen Valdes-Vaillant; Juliet Mejías-Palmero; Marileyxis Regla López, Laureano Frizzo, Marcelo Signorini, Peter Bossier Impact of probiotics on growth performance and immune system: a meta-analysis Impacto de los probióticos en el desempeño del crecimiento y sistema immune: un meta-análisis	372
Luis Rafael Martinez Córdova*, Kadiya Calderón Alvarado, Roberto Carlos Vázquez Euan y Marcel Martínez Porchas Avances en la caracterización y manipulación de comunidades microbianas asociadas a biopelículas y bioflóculos Advances in the characterization and manipulation of microbial communities associated with biofilms and bioflocs	390
Ernesto Larios Soriano*, Ana Denise Re Araujo, Dariel Tovar Ramírez, Bruno Gómez-Gil, Lus M. López, Mario A. Galaviz Microbiota intestinal y la salud en los peces: Caso de estudio en la nutrición de <i>Seriola lalandi</i> y <i>Totoaba macdonaldi</i> en diferentes condiciones térmicas Intestinal microbiota and fish health: case study on the nutrition of <i>Seriola lalandi</i> and <i>Totoaba macdonaldi</i> in different thermal conditions	410
Luciana Raggi Hoyos, Mateo Amillano Cisneros Pamela Navarrete Ramírez, Ma. Gisela Ríos Durán, C. Cristian Martínez Chávez, Ruth Pedroza Islas y Carlos A. Martínez-Palacios* Presente y futuro de los probióticos en la nutrición de peces y la modulación de su microbiota Present and future of probiotics in fish nutrition and modulation of its microbiota	428

Uso de Carbohidratos en Alimentos para Pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) y su Efecto en el Metabolismo Intermediario

Rocío Guerrero-Zárate¹, Carlos A. Álvarez-González¹, Ronald Jesus-Contreras¹, Raúl Llera-Herrera², Otilio Méndez-Marín¹, Mario A. Galaviz³, Lus M. López³

¹Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), Carretera Villahermosa-Cárdenas s/n, Km 0, C.P. 86039 Villahermosa, Tabasco, México.

²Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cap. Joel Montes Camarena, Cerro del Vigía, 82040 Mazatlán, Sinaloa, México.

³Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Facultad de Ciencias Marinas, Carretera Tijuana-Ensenada 3917, Playitas, C.P. 22860, Ensenada, B.C., México

*E-mail: rocio7224@hotmail.com

Resumen

El metabolismo de carbohidratos ha sido estudiado en varias especies de peces, principalmente teleósteos. En la presente investigación nosotros abordamos el estudio del metabolismo intermediario por la inclusión de carbohidratos en la dieta de *A. tropicus*, un pez carnívoro ancestral de la familia Lepisosteidae, la cual se originó en el cretácico durante la era mesozoica y divergió antes de la tercera duplicación completa del genoma común a los teleósteos. Nuestros resultados revelan que, a diferencia de los descrito hasta ahora en la mayoría de los teleósteos carnívoros, *A. tropicus* regula adecuadamente las rutas de la glucólisis, la gluconeogénesis y la activación de la ruta de la lipogénesis a partir de carbohidratos. Como resultado, no se observan diferencias en el nivel glicémico en plasma ni en los indicadores de crecimiento y utilización del alimento cuando los pejelagartos consumen entre un 14 y 29% de almidón.

Palabras clave: peces ancestrales, transcriptoma, glucólisis, gluconeogénesis, lipogénesis, metabolismo hepático

Introducción

El estudio del metabolismo de carbohidratos en peces ha sido abordado a través de los años en distintas especies (Wilson, 1994; Moon, 2001; Hemre, Mommsen and Krogdahl, 2002; Stone, 2003; Krogdahl, Hemre and Mommsen, 2005; Polakof, Mommsen and Soengas, 2011; Polakof *et al.*, 2012; Polakof and Panserat, 2016; Kamalam, Medale and Panserat, 2017). No obstante, los mecanismos de regulación y las razones por las cuáles algunas especies pueden utilizarlos de forma más eficiente que otras aún no han sido esclarecidos completamente (Polakof *et al.*, 2012).

En los peces los carbohidratos son importantes debido a que sus tejidos cerebrales, renales, oculares y branquiales utilizan la glucosa como fuente preferente de energía (Polakof, Mommsen and Soengas, 2011). A pesar de ello, no tienen un requerimiento específico de carbohidratos debido a que tienen la capacidad de sintetizar glucosa a partir de precursores como lactato, piruvato y aminoácidos (Kamalam, Medale and Panserat, 2017). El uso de carbohidratos en la formulación de sus dietas optimiza el aprovechamiento de macronutrientes como las proteínas y los lípidos. Esto es relevante en la fabricación de alimentos para peces comerciales, ya que se disminuyen los costos de elaboración al sustituir la harina de pescado por ingredientes de origen vegetal o inclusive por almidones (Krogdahl, Hemre and Mommsen, 2005; Sørensen, 2012).

Sin embargo, está demostrado que la eficiencia en el aprovechamiento de carbohidratos es altamente variable entre especies. Las pruebas de tolerancia a la glucosa (por sus siglas en inglés, GTT) indican que la hiperglicemia, que se observa en algunas especies durante la prueba, parece estar relacionada con los hábitos alimenticios (Polakof *et al.*, 2012), de tal forma que las especies carnívoras muestran una menor tolerancia a la glucosa que las especies omnívoras y herbívoras (Hemre, Mommsen and Krogdahl, 2002; Enes *et al.*, 2008).

Para tratar de explicar la pobre utilización de carbohidratos por los peces, especialmente los carnívoros, se han propuesto varias hipótesis. Entre ellas se descartaron: la deficiencia de

amilasas e insulina, la carencia de receptores GLUT dependientes de insulina (Hemre, Mommsen and Krogdahl, 2002; Krogdahl, Hemre and Mommsen, 2005) y la pérdida de la glucoquinasa (GK) dependiente de glucosa (Borrebaek and Waagbo, 1993; Tranulis *et al.*, 1996; Caseras *et al.*, 2000, 2002; Panserat, C. Médale, *et al.*, 2000; Panserat, F. Médale, *et al.*, 2000; S Panserat *et al.*, 2001; S. Panserat *et al.*, 2001; Enes *et al.*, 2006, 2008).

Por otro lado, aún son consideradas hipótesis válidas: la baja capacidad de la glucosa respecto a algunos aminoácidos específicos como inductores de la secreción de insulina (Plisetskaya *et al.*, 1991; Andoh, 2007), un número relativamente bajo de receptores de insulina, la escasa lipogénesis hepática inducida a partir de los carbohidratos ingeridos (Panserat *et al.*, 2009; Polakof, Mommsen and Soengas, 2011; Polakof *et al.*, 2012) y la pérdida de un adecuado balance entre la captación de glucosa hepática (glucólisis) y la producción de glucosa endógena (gluconeogénesis) (Panserat, C. Médale, *et al.*, 2000; Panserat, F. Médale, *et al.*, 2000; Enes *et al.*, 2006, 2008; Polakof, Skiba-Cassy and Panserat, 2009; Polakof, Mommsen and Soengas, 2011).

Aunque existe información acerca de la inducción de la liberación de insulina por la glucosa, en especies como el mixino (*Myxine glutinosa*) (Polakof *et al.*, 2012) y de algunos aspectos del metabolismo de la glucosa en elasmobranquios (Polakof, Mommsen and Soengas, 2011) y esturiones (Hung *et al.*, 1989; Fynn-Aikins, Hung and Hughes, 1993; Deng, Refstie and Hung, 2001; Furné *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2015), la mayor cantidad de información que se ha generado respecto al metabolismo de carbohidratos en peces se concentra en los teleósteos, especialmente en la trucha arcoíris (*O. mykiss*) (Polakof and Panserat, 2016; Kamalam, Medale and Panserat, 2017). Mientras que en otras especies como los Lepisosteidos (*Lepisosteus sp.* y *Atractosteus sp.*) la forma en que se regula su metabolismo es prácticamente desconocida.

Los lepisosteidos son peces que tuvieron su origen en el cretácico, durante la era Mesozoica, (Wiley & Schultze, 1984). Actualmente, existen siete especies todas ellas habitan en el continente americano (Wright *et al.*, 2012). Se han descrito como peces con un genoma en

una “posición basal” respecto a los teleósteos, ya que su linaje divergió antes de que se diera la tercera duplicación completa del genoma, común a los teleósteos (Ts3R). Por lo que conservan una relación de sinténia (conservación en el contenido, orden y orientación de genes en sus cromosomas) con los humanos, mayor que la de especies de peces modelo como *Danio rerio* (Amores *et al.*, 2011). Por ello, basado en el estudio del genoma de *Lepisosteus oculatus* se propuso que estos organismos pueden ser usados como modelos en estudios genéticos y fisiológicos para facilitar la comparación entre teleósteos y humanos (Braasch *et al.*, 2016).

En México podemos encontrar dos especies: el catán (*Atractosteus spatula*) que se distribuye por el Golfo de México desde Florida, Estados Unidos hasta Veracruz, México y el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) que habita en el Sureste de México y Centro América. En la División Académica de Ciencias Biológicas-UJAT *A. tropicus*, ha sido investigado desde hace más de 30 años debido a la relevancia que tiene en la cultura y economía tabasqueña, además de que sus poblaciones silvestres se vieron presionadas por la sobrepesca. Las investigaciones en nutrición han clasificado al pejelagarto como un carnívoro con capacidad para aprovechar ingredientes alternativos (Frías-Quintana, Álvarez-González and Márquez-Couturier, 2010; Guerrero-Zárate *et al.*, 2014), y recientemente se ha demostrado que el crecimiento durante la etapa larval mejora al sustituir en su dieta el 15% del relleno de celulosa por almidón de maíz (Frías-Quintana *et al.*, 2016). No obstante, se desconocía cómo se regula el metabolismo de glúcidos en esta especie, cómo responde frente a diferentes condiciones glicémicas y hasta qué punto la inclusión de carbohidratos en su dieta podría causarle desordenes metabólicos.

Por otro lado, en los últimos años se han incrementado las investigaciones respecto a la interacción de los carbohidratos y lípidos como fuente de energía en los peces, así como de la determinación de una proporción óptima entre ambos macronutrientes (Dias *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013; Shuyan *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016; Sterzelecki *et al.*, 2017; Torfi Mozanzadeh *et al.*, 2017). Sin embargo, todos ellos se basan en análisis de indicadores de desempeño productivo, actividad de enzimas metabólicas y

expresión de genes clave de las principales rutas del metabolismo de carbohidratos, pero la respuesta molecular aún permanece poco conocida. Por esta razón, resulta esencial un análisis global de expresión genética (transcriptómico) en respuesta a la interacción de los lípidos y carbohidratos para comprender los mecanismos biológicos implicados en peces carnívoros.

Por lo anterior, el presente proyecto tuvo como objetivo evaluar, por medio del rendimiento, técnicas bioquímicas y un enfoque transcriptómico, cómo la sustitución de lípidos por carbohidratos en las dietas afecta el metabolismo intermediario hepático en el pejelagarto.

Materiales y métodos

2.1 Diseño experimental y preparación de dietas

En este estudio se utilizó un diseño completo aleatorizado para evaluar el efecto de la proporción carbohidrato (CHO)/ lípidos (L) de la dieta en crías de *A. tropicus*. La dieta 1 (control) fue formulada con base en los requerimientos de proteína, lípidos y energía establecidos para pejelagarto (Márquez-Couturier *et al.*, 2006) y a la dieta con harina de pescado propuesta por Frías-Quintana *et al.* (2016). Mientras que el resto de las dietas experimentales fueron diseñadas con incrementos graduales de 25% de almidón de maíz pregelatinizado, mientras los lípidos añadidos se reducían en 25% (Tabla 1). Como resultado, se obtuvieron cinco dietas prácticas con diferentes proporciones de CHO/L (0.75, 1.28, 2.10, 2.52, and 4.63). Cada dieta fue asignada a tres unidades experimentales (tinas de 70 L). Las dietas fueron formuladas usando el software Mixit-Win V.5 (San Diego, CA).

Como fuente principal de proteínas se emplearon harina e hidrolizado de pescado, mientras como fuente de lípidos se usó aceite de pescado y lecitina de soya, y como fuente principal de carbohidratos se utilizó almidón de maíz pregelatinizado, de acuerdo a los resultados obtenidos por Frías-Quintana *et al.*, (2016) (Tabla 1). Todos los ingredientes fueron finamente molidos y tamizados. Los macronutrientes se mezclaron por 15 min, posteriormente se añadieron las vitaminas y se mezcló por 15 min más. Entonces se añadieron lentamente los ingredientes líquidos y se mezcló por 15 min. Finalmente se adiciono agua

destilada y se mezcló por otros 15 min. Las dietas fueron peletizadas y secadas a 50° C por 10 h, finalmente fueron trituradas y cribadas para cubrir el rango de tamaño de partícula requerido durante la crianza larvaria (250-1000 µm). Se almacenaron a -20° C. Los peces fueron alimentados manualmente a saciedad aparente cuatro veces al día (8:00, 11:00, 14:00 and 17:00) por 45 días. El consumo de alimento fue registrado en cada unidad experimental diariamente.

Tabla 1. Composición química y análisis proximal de dietas experimentales para pejelagarto (*A. tropicus*)

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Proporción CHO/L				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
Harina de sardina ¹	546	546	546	546	546
Aceite de sardina ¹	72	54	35	17.9	0
Hidrolizado de pescado ¹	100	100	100	100	100
Lecitina de soya ²	36	27	18	9	0
Almidón de maíz pregelatinizado ³	0	62.5	125	188	250
Grenetina ⁴	20	20	20	20	20
Premezcla de vitaminas y minerales ⁵	15	15	15	15	15
Vitamina C ⁶	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Harina de sorgo 8- 10% ⁷	210	175	140	104	68
Composición proximal (g kg⁻¹)					
Materia seca	975	974	983	950	976
Proteína cruda	425	420	418	418	415
Lípidos	183	141	107	99.9	62.4
Carbohidratos	138	180	225	252	289
Cenizas	98	110	114	108	118
Proporción CHO/L	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
Energía (MJ kg ⁻¹) ⁸	19.6	18.6	18.0	18.2	17.2

¹Proteínas Marinas y Agropecuarias, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México. ²Pronat Ultra, Mérida, Yucatán, México. ³MSA Industrializadora de Maíz, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México. ⁴D'gari Productos alimenticios y dietéticos Relámpago, Tlalpan, Edomex, México. ⁵Consorcio Súper Sociedad Anónima de Capital Variable. (para trucha, cortesía), ⁶DMS (Heerlen, Netherlands, agente activo 35%). ⁷GALMEX Comercializadora de Insumos Agrícolas, Villahermosa, Tabasco, México. Guadalajara, Jalisco, México. ⁸Calculada usando valores de 23.6 KJ g⁻¹ para proteínas, 39.56 KJ g⁻¹ para lípidos and 17.2 para carbohidratos (Gao *et al.*, 2010).

2.2 Cultivo de organismos experimentales

Las crías de pejelagarto fueron obtenidas del lote de reproductores que se encuentra en el Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. El desove fue inducido en una hembra de *A. tropicus* con una inyección intraperitoneal de la hormona GnRH (0.35 µg por Kg de

peso). La hembra fue colocada junto con 3 machos en un estanque de 2000 L, el cual contaba con sustrato artificial para la adhesión de los huevos. Cuando las larvas iniciaron el nado libre (4 DDE) se transfirieron a tinajas circulares de 70 L. Los peces fueron aclimatados al alimento balanceado mediante un régimen de coalimentación con *Artemia* (nauplios y biomasa congelada) y una dieta basal, D1. (Tabla 1; Frías-Quintana, Álvarez-González, & Márquez-Couturier, 2010), hasta los 17 días después de la eclosión (DDE) (Márquez-Couturier *et al.*, 2006), después de esto se alimentaron únicamente con la dieta basal hasta el inicio del experimento (30 DDE).

2.3 Sistema experimental y parámetros de crecimiento

El experimento fue realizado en un sistema de recirculación suplementado con agua dulce, que contaba con filtración biológica y mecánica, así como aireación en el reservorio principal. La temperatura del agua fue mantenida a $28.9 \pm 1.2^\circ \text{C}$ bajo fotoperiodo natural (12:12). Durante el periodo experimental los parámetros de calidad del agua fueron monitoreados diariamente, el pH fue de 8.0 ± 0.4 (pH pen meter ST10, Ohaus, Parsippany, NJ), oxígeno disuelto $5.1 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ (DO instrument, YSI 55-12FT, Yellow Springs, OH) nitritos y amonio $0.19 \pm 0.13 \text{ mg L}^{-1}$ (Ammonia Test Kit, Mars Fishcare, Chalfont, PA). Al inicio del periodo experimental, 150 crías fueron colocadas en 15 tinajas circulares 70 L de capacidad, cada tina contaba con 10 peces (peso promedio inicial $0.50 \pm 0.01 \text{ g}$). El peso y longitud de todos los organismos fue analizada estadísticamente para asegurar que no existían diferencias estadísticas entre ellos. Cada dos semanas, durante el periodo experimental, los peces fueron pesados, medidos y contados para estimar la supervivencia.

2.4 Colecta de muestras

Al finalizar el experimento de crecimiento (75 DDE), todos los peces de cada unidad experimental fueron pesados y medidos individualmente. Para evitar que el estrés debido a la manipulación influyera sobre los parámetros bioquímicos del plasma, los peces fueron regresados a sus respectivas unidades experimentales y alimentados durante un día más. Posteriormente los peces fueron puestos en ayuno durante 24 h, y entonces se anestesiaron con aceite de clavo (0.1 mL). Tres peces de cada unidad experimental fueron seleccionados

al azar. Las muestras de sangre fueron colectadas a partir de la vena caudal usando jeringas que contenían EDTA como anticoagulante (342 mM) e inmediatamente fueron centrifugadas a $10\,000 \times g$ por 1 min; las muestras de plasma se analizaron inmediatamente para determinar los parámetros bioquímicos. Los peces, todavía anestesiados, fueron sacrificados por personal capacitado mediante decapitación (NOM-062-ZOO-1999, de México) entonces fueron rápidamente disecados en hielo para obtener muestras de hígado e intestinos para el análisis de actividad de enzimas digestivas y metabólicas, también se tomaron muestras de hígado para análisis de expresión genética y análisis histológicos. Otros tres peces de cada unidad experimental fueron anestesiados, sacrificados y disecados, de la misma forma que se explicó anteriormente, para los cálculos de índices viscerosomático y hepatosomático, así como para análisis proximales del cuerpo (en canal) y de hígados.

2.5 Índices de crecimiento y de calidad de alimento

Para evaluar el rendimiento de los peces, se calcularon los siguientes parámetros: Supervivencia (S, %) = $100 [(\text{número final de peces}) / (\text{número inicial de peces})]$. Ganancia en peso (WG, %) = $100 [(\text{peso final promedio} - \text{peso inicial promedio}) / \text{peso inicial promedio}]$. Tasa específica de crecimiento (SGR % de ganancia de peso diario) = $100 (\ln \text{ peso final promedio} - \ln \text{ peso inicial promedio}) / \text{días}$. Tasa de conversión alimenticia (FCR) = $(\text{ingesta individual de alimento, peso seco}) / (\text{ganancia en peso individual, peso húmedo})$. Factor de condición (K, %) = $100 [\text{peso final promedio (g)} / \text{longitud estándar (cm)}]^3$.

2.6 Índices hepatosomático y viscerosomático

Se pesaron los peces completos, vísceras e hígados de tres peces de cada unidad experimental para calcular el índice viscerosomático (VSI) = $100 [(\text{peso de vísceras}) / (\text{peso del pez})]$ y el índice hepatosomático (HSI) = $100 [(\text{peso del hígado}) / (\text{peso del pez})]$. Los peces fueron eviscerados y se les retiró la piel y cabeza para dejar solamente el cuerpo en canal. Estos se congelaron y liofilizaron para realizar el análisis químico proximal. Los hígados de cada pez fueron separados e inmediatamente congelados a -80°C hasta realizar los análisis de actividad de enzimas metabólicas y determinación del contenido de glucógeno y lípidos hepáticos.

2.7 Análisis de composición química proximal

La composición proximal de las dietas experimentales y de los peces (canal) fue determinada de acuerdo a la Association of Official Analytical Chemist procedures (William Horwitz, 2000). La humedad fue calculada por gravimetría después de secar las muestras a 105°C por 24 h. El contenido de proteína cruda fue determinado por el método Kjendahl usando un sistema de destilación automática VAPODEST 10s, (Gerhardt, Königswinter, Alemania) y un sistema de titulación automática TitroLine® 5000 (SI Analytics, College Station, TX). Los lípidos totales fueron determinados por la extracción con metanol-cloroformo (Folch, Lees and Sloan Stanley, 1957). El almidón fue determinado por el método con amilasa y glucosa oxidasa (Thivend, Mercier and Guilbot, 1972). El contenido de cenizas totales fue determinado por gravimetría después de la combustión de las muestras a 550°C por 8 h.

2.8 Análisis bioquímicos en plasma e hígados

Los parámetros bioquímicos en plasma fueron analizados usando kits comerciales (Pointe Scientific, Canton, MI) adaptados a microplaca (xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad, Hercules, CA). La glucosa en plasma fue determinada por el método de glucosa oxidasa, los triglicéridos mediante una reacción enzimática usando la enzima glicerol-3-fosfato oxidasa, el colesterol fue determinado usando colesterol esterasa y colesterol oxidasa, y la albúmina se determinó por el método con verde de bromocresol.

Las muestras congeladas de hígados fueron disgregadas en piezas pequeñas en una caja de Petri fría y se dividieron homogéneamente en dos alícuotas que sirvieron para determinar el glucógeno hepático y la actividad de enzimas metabólicas. El glucógeno hepático fue determinado usando 50 mg de hígado congelado. Las muestras individuales se homogenizaron por disrupción ultrasónica con 7.5 vols de 600 mM de ácido perclórico (frio) y entonces se neutralizaron usando bicarbonato de sodio 1 M. El homogenado fue centrifugado a $1000 \times g$ por 10 min a -4°C. Los niveles de glicógeno en hígado fueron medidos usando el método de Keppler and Decker (1974). La glucosa obtenida después de la hidrólisis del glucógeno fue determinada con un kit comercial (Pointe Scientific, Canton, MI). El contenido de lípidos hepáticos fue determinado extrayendo los lípidos con

diclorometano-metanol (2:1 v:v) por 12 h, seguido por la separación en 2 mL de cloroformo, y cuantificado gravimétricamente (Folch, Lees and Sloan Stanley, 1957).

2.9 Actividad de enzimas digestivas

Tres intestinos de cada unidad experimental fueron homogenizados con buffer 50 mM Tris-HCl, 25 mM CaCl₂ (pH 7.5) usando un homogenizador de tejidos Ultra-Turrax IKA T18 basic. El homogenado fue centrifugado a $16,000 \times g$ por 15 min at -4°C, el sobrenadante fue recuperado y almacenado en alícuotas a -80°C. La actividad enzimática de las proteasas alcalinas fue determinada de acuerdo al método descrito por Walter (1984) usando caseína grado Hammarsten 0.5% en un buffer (100 mM Tris-HCl; 10 mM CaCl₂, pH 9); una unidad de actividad fue definida como 1 µg de tirosina liberada por minuto a Abs₂₈₀. La actividad lipasa fue medida como lo describe Versaw, Cuppett, Winters, and Williams, (1989) pero utilizando β-naftil acetato 100 mM como sustrato; una unidad de actividad fue definida como 1 µg de naftol liberado por minuto a 540 nm. La actividad α-amilasa (EC 3.2.1.1) fue determinada por el método de Robyt and Whelan (1968) usando como sustrato almidón soluble (2%) en un buffer (100 mM citrato-fosfato; 50 mM NaCl, pH 7.5), una unidad de amilasa fue definida como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de maltosa por minuto a 600 nm. Todas las actividades enzimáticas fueron expresadas por mg de proteína. La concentración de proteína soluble fue determinada de acuerdo a Bradford (1976) usando una curva estándar con albumina bovina sérica (BSA). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.10 Actividad de enzimas metabólicas

Una muestra congelada de hígado (500 mg) fue homogenizada en un Potter-Elvehjem con 9 vols de solución tampón fría 50 mM Tris (pH 7.6), 5 mM EDTA, 2 mM 1,4 dithiothreitol (DTT), y un cocktail comercial inhibidor de proteasas (AEBSF 2 mM, aprotinina 0.3 µM, bestatina 116 µM, E-64 14 µM, leupeptina 1 µM and EDTA 1 mM) (Conde-Sieira, Soengas and Valente, 2015). El homogenado fue centrifugado a $900 \times g$ por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se dividió en dos alícuotas. Una de ellas fue utilizada para medir las actividades hexoquinasa (EC 2.7.1.1; HK), glucoquinasa (EC 2.7.1.2; GK), fructosa-1, 6-

bifosfatasa (EC 3.1.3.11; FBPase) y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (EC 1.1.1.49; G6PD). La segunda alícuota fue centrifugada a $10\,000 \times g$ por 20 min, la fracción citosólica fue utilizada para medir la actividad piruvato quinasa (EC 2.7.1.40; PK) (Kirchner, Kaushik and Panserat, 2003).

Las actividades HK y GK fueron medidas usando 50 mM imidazole (pH 8), 7 mM ATP, 5 mM MgCl_2 , 2 mM NADP, 0.15 U mL^{-1} , G6PD, 0.1 U mL^{-1} 6-fosfogluconato dehidrogenasa y 1 mM de glucosa (excepto para los controles) (Borrebaek and Waagbo, 1993; Tranulis *et al.*, 1996; Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2003).

FBPase fue determinada usando 85 mM imidazole (pH 7.7), 0.5 mM NADP, 5 mM MgCl_2 , 2 U mL^{-1} G6PD, 2 U mL^{-1} fosfogluconato isomerasa, y 1 mM fructosa-1, 6-bifosfatasa (excepto para los controles) (Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2003).

La actividad G6PD fue determinada usando 78 mM imidazole (pH 7.7), 5 mM MgCl_2 , 0.5 mM NADP, 1 mM glucosa-6-fosfato (excepto para los controles) (Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2003).

Para medir la actividad fosfoenol piruvato carboxiquinasa (EC 4.1.1.32; PEPCK) un fragmento de hígado (500 mg) fue homogenizado con 10 volúmenes de solución tampón fría (10 mM ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico (HEPES), 250 mM sacarosa, 1 mM DTT). El homogenado fue centrifugado a $900 \times g$ por 10 min, el sobrenadante fue recuperado y centrifugado a $10\,000 \times g$ por 20 min. Se recuperó la fase citosólica y fue dividida en alícuotas y almacenada a -80°C hasta realizar el análisis de actividad enzimática (Kirchner *et al.*, 2003). La actividad PK fue medida como lo describen Laiz-Carrión, Martín Del Río, Miguez, Mancera, & Soengas (2003) utilizando 50 mM imidazole-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 0.15 mM NADH, 1 mM ADP, 2 mM PEP (excepto para los controles y 2 U de lactato deshidrogenasa).

La actividad PEPCKc fue determinada usando 50 mM Tris-HCl (7.5), 1 mM MnCl_2 , 20 mM NaHCO_3 , 0.3 mM NADH, 1.5 mM PEP, 2 U malato deshidrogenasa, y 0.2 mM de

deoxiguanosina 5'- difosfato (dGDP, omitida en los controles) (Petrescu *et al.*, 1979; Polakof, Míguez and Soengas, 2008).

Las actividades enzimáticas fueron determinadas usando un lector de microplacas xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad, Hercules, CA). Las reacciones enzimáticas fueron determinadas a 37 °C por el incremento o decremento en la absorbancia del NAD(P)H a 340 nm. Todas las actividades enzimáticas fueron expresadas por mg de proteína soluble en el tejido hepático. La concentración de proteínas de cada tipo de extracto fue determinada usando el reactivo Quick Start™ Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA) y una curva patrón con albumina bovina sérica (BSA), basado en el método descrito por Bradford (1976). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

2.11 Análisis histológico

Para el análisis histológico, se tomaron dos fragmentos de hígado y fueron inmediatamente sumergidas en formalina neutra al 10% durante 24 h. Posteriormente, las muestras se deshidrataron en gradientes de etanol (50°, 70°, 80°, 96° y 100°), fueron aclaradas en alcohol 100°-xilol y embebidas en bloques de parafina. Se realizaron cortes de 7µm con un microtomo Reichert-Jung (model Hn40) y fueron teñidas con el método de hematoxilina y eosina (H&E) para observaciones histológicas generales (Humason 1979, Hinton 1990, Aguilar 1996). Un microscopio UNICO (modelo G380 LED) fue utilizado para las descripciones.

2.12 Análisis transcriptómico

Para el análisis de expresión genética, un fragmento de hígado de aproximadamente 5 mm fue colocado en RNA later (5 volúmenes), y conservado a 4°C durante 24 h. Posteriormente fue almacenado a -20°C hasta su análisis. De las 9 muestras de hígado colectadas por tratamiento, se seleccionaron al azar 3 muestras para la secuenciación individual del transcriptoma. Estas fueron enviadas para su procesamiento a la UUSMB-IBT, UNAM, México.

Extracción de RNA, preparación de librerías y secuenciación: El ARN total de las muestras individuales de hígado fue extraído usando el método de TRIzol (Rio *et al.*, 2010) La calidad del ARN total fue comprobada mediante electroforesis capilar automatizada con un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El RNA de alta calidad fue usado para la preparación y secuenciación de bibliotecas utilizando el Kit TruSeq Stranded mRNA (Illumina Inc, San Diego, CA) y la plataforma NextSeq (2x75pb)

Ensamble de transcriptoma de Novo: Las lecturas fueron limpiadas para remover los adaptadores y lecturas de mala calidad con el software Trimmomatic V 0.33 (Bolger, Lohse and Usadel, 2014). El transcriptoma fue ensamblado de novo usando el software Trinity V 2.3.2 (Grabherr *et al.*, 2013)

Anotación: Después del ensamble, se realizó la anotación funcional de los transcritos utilizando Trinotate, el cual predice las regiones codificantes usando TransDecoder. También, busca los transcritos completos y las regiones codificantes contra SwissProt, HMMER/PFAM (<https://github.com/Trinotate/Trinotate.github.io/wiki>).

Análisis de expresión diferencial: Para cuantificar la abundancia de transcritos se utilizó el programa Kallisto (<https://pachterlab.github.io/kallisto/about>). Los análisis de expresión diferencial fueron realizados usando edgeR (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>), para los análisis se utilizó un nivel de significancia de $P < 0.001$ y un $FDR < 0.01$.

2.13 Análisis estadísticos

Los datos fueron estadísticamente analizados por un ANOVA de una vía, previamente se verificó que se cumplieran los supuestos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov tests) y homocedasticidad (Levine test). Cuando se encontraron diferencias significativas se aplicó una prueba de Tukey. Los análisis fueron realizados con el software estadístico Statistica TM v.8.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK) usando un nivel de significancia de $P < 0.05$. los resultados fueron presentados como medias $\pm$ desviación estándar, SD.

2.14 Curva de tolerancia a la glucosa

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con dos factores (dosis de dextrosa y tiempo después del tratamiento). Se emplearon tres dosis (0, 0.6 y 1.2 g/ Kg de dextrosa por kilogramo) y siete tiempos después de la aplicación del tratamiento (0, 1, 3, 5, 7, 10 y 24 h). Se utilizaron 189 pejelagartos de 23.05 ± 2.04 g los cuales se anestesiaron con aceite de clavo (0.1 ml/L) por 10 min, se les administro dextrosa mediante una inyección intraperitoneal y se obtuvo una muestra de sangre de 200 μ l mediante una punción en la vena caudal usando jeringas que contenían EDTA como anticoagulante (342 mM) e inmediatamente fueron centrifugadas a $10\,000 \times g$ por 1 min. La glucosa en plasma fue determinada por el método de glucosa oxidasa. Se empleo un análisis de varianza de dos vías para verificar la existencia de diferencias significativas, previamente se verificaron los supuestos del ANOVA. Se utilizó un nivel de significancia de $P < 0.05$.

Resultados

3.1 Parámetros de rendimiento, utilización de alimento y supervivencia

Los resultados de rendimiento de los peces (FBW, WG, SGR y K) y utilización del alimento (FI, FCR) no mostraron diferencias significativas entre dietas. La supervivencia estuvo en el rango de 80 a 96%, sin diferencias estadísticas entre los tratamientos ($P > 0.05$) (Tabla 2). El HSI fue significativamente influenciado por las proporciones CHO/L de las dietas, observándose el mayor índice en los peces alimentados con la proporción CHO/L de 2.10 ($P < 0.05$), la cual no fue significativamente diferente de las proporciones de 1.28 y 2.52 (Tabla 2). Por otro lado, el VSI no mostró diferencias significativas entre tratamientos.

Tabla 2. Parámetros de crecimiento y de rendimiento de pejelagartos alimentados con las dietas experimentales. Los valores son presentados como las medias $\pm$ SD, n=3. Las medias con diferentes superíndices en la misma fila son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

	Proporción CHO/L en dietas				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
S ¹	86.7 $\pm$ 18.8	93.3 $\pm$ 9.4	80.0 $\pm$ 8.2	90.0 $\pm$ 14.1	96.7 $\pm$ 4.7
IBW ²	0.50	0.51	0.51	0.50	0.50
FBW ³	12.54 $\pm$ 1.24	14.23 $\pm$ 1.51	17.12 $\pm$ 1.45	13.82 $\pm$ 2.84	14.68 $\pm$ 0.77
WG ⁴	2387.5 $\pm$ 245.2	2637.1 $\pm$ 406.8	3129.7 $\pm$ 348.1	2677.8 $\pm$ 560.6	2814.2 $\pm$ 123.2
SGR ⁵	7.13 $\pm$ 0.22	7.41 $\pm$ 0.23	7.81 $\pm$ 0.19	7.36 $\pm$ 0.44	7.49 $\pm$ 0.09
FCR ⁶	1.06 $\pm$ 0.46	0.97 $\pm$ 0.19	1.00 $\pm$ 0.10	1.12 $\pm$ 0.61	1.10 $\pm$ 0.23
FI ⁷	0.29 $\pm$ 0.13	0.29 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.12	0.34 $\pm$ 0.05
K ⁸	1.36 $\pm$ 0.16	1.07 $\pm$ 0.13	1.06 $\pm$ 0.11	1.27 $\pm$ 0.32	1.33 $\pm$ 0.20
VSI ⁹	8.76 $\pm$ 1.18	8.84 $\pm$ 0.87	8.88 $\pm$ 0.77	8.97 $\pm$ 1.61	9.6 $\pm$ 1.16
HSI ¹⁰	3.19 $\pm$ 0.51 ^{bc}	3.72 $\pm$ 0.33 ^{ab}	4.06 $\pm$ 0.42 ^a	3.67 $\pm$ 0.48 ^{abc}	3.11 $\pm$ 0.37 ^c

¹ S, supervivencia. ² IBW, peso inicial promedio. ³ FBW, peso final promedio. ⁴ WG, ganancia en peso. ⁵ SGR, tasa específica de crecimiento. ⁶ FCR, tasa de conversión alimenticia. ⁷ FI, consumo de alimento (g día⁻¹). ⁸ K, factor de condición. ⁹ VSI, índice viscerosomático. ¹⁰ HSI, índice hepatosomático.

3.2 Composición proximal

El contenido de lípidos del cuerpo de los pejelagartos disminuyó significativamente conforme se incrementaba la proporción de CHO/L de las dietas de 2.10 a 4.63 ($P < 0.05$). Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticas en el contenido de proteínas, humedad y cenizas entre los tratamientos.

En el caso de los hígados, la cantidad de lípidos fue significativamente mayor en los peces alimentados con la proporción CHO/L de 0.75, sin mostrar diferencias con los peces que recibieron la dieta con las CHO/L de 1.28 y 2.10; y con una tendencia a disminuir conforme la proporción CHO/L se incrementó ($P < 0.05$). En cuanto al glucógeno, se observó una tendencia contraria, ya que los peces alimentados con la proporción CHO/L de 0.75 mostraron la menor concentración de glucógeno la cual tiende a incrementarse significativamente conforme se aumenta la proporción CHO/L de las dietas ($P < 0.05$).

Tabla 3. Composición proximal de los cuerpos e hígados de pejelagartos alimentados con las dietas experimentales

	Proporción CHO/L en dietas				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
<i>Peces en canal</i> (g kg ⁻¹ de peso en base húmeda)					
Humedad	709.0 ± 20.3	722.4 ± 24.3	705.4 ± 9.5	726.4 ± 31.3	735.7 ± 14.8
Proteína	191.5 ± 10.7	186.9 ± 8.6	203.0 ± 4.2	197.5 ± 17.7	197.2 ± 7.7
Lípidos	43.7 ± 4.5 ^a	39.3 ± 6.5 ^a	40.9 ± 2.2 ^a	28.3 ± 2.6 ^b	23.1 ± 2.3 ^b
Cenizas	31.2 ± 2.1	31.2 ± 4.5	27.5 ± 1.8	34.8 ± 0.7	31.8 ± 5.4
<i>Hígado</i>					
Lípidos (g kg ⁻¹)	126.1 ± 7.3 ^a	135.1 ± 7.2 ^a	114.5 ± 16.5 ^{ab}	86.0 ± 6.4 ^{bc}	82.39 ± 12.4 ^c
Glucógeno (μmol g ⁻¹)	26.16 ± 3.1 ^b	31.62 ± 4.1 ^{ab}	35.25 ± 3.6 ^a	35.25 ± 8.0 ^a	36.78 ± 5.2 ^a

Los valores son presentados como medias ± SD, n=3. Las medias con diferentes superíndices en la misma fila son significativamente diferentes (P <0.05).

3.3 Composición bioquímica del plasma

El colesterol y los triglicéridos fueron notablemente afectados por las dietas (P < 0.05) (Table 4). Las menores concentraciones de colesterol y triglicéridos se observaron en los peces alimentados con la dieta con proporción CHO/L de 4.63, y fueron significativamente diferentes de los alimentados con las dietas con proporciones de CHO/L de 0.75, 1.28 y 2.10. En el caso de la glucosa y la albúmina no se encontraron diferencias significativas (P >0.05).

Tabla 4. Parámetros bioquímicos del plasma de pejelagarto alimentados con las dietas experimentales después de 24 h de ayuno

Parámetros	Proporción CHO/L en dietas				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
Glucosa (mg dL ⁻¹)	115.23 ± 26.48	114.56 ± 8.10	107.98 ± 12.26	127.48 ± 26.26	123.18 ± 18.05
Triglicéridos (mg dL ⁻¹)	273.96 ± 45.48 ^a	277.69 ± 42.82 ^a	277.36 ± 35.32 ^a	227.31 ± 36.64 ^{ab}	189.3 ± 34.90 ^b
Colesterol (mg dL ⁻¹)	137.34 ± 23.22 ^{ab}	141.72 ± 20.89 ^a	137.42 ± 13.47 ^{ab}	121.41 ± 22.28 ^{bc}	116.28 ± 9.54 ^c
Albumina (g dL ⁻¹)	7.64 ± 3.18	7.34 ± 2.15	7.98 ± 2.14	5.83 ± 2.51	5.14 ± 0.88

Los valores son presentados como medias ± SD, n=9 peces por tratamiento. Las medias con diferentes superíndices en la misma fila son significativamente diferentes (P <0.05).

3.4 Actividad de enzimas digestivas

Las actividades de las enzimas digestivas proteasas, lipasas y α-amilasa no mostraron diferencias entre los tratamientos aplicados (P >0.05). Sin embargo, la actividad α-amilasa y

lipasa tienden a incrementarse conforme aumenta la proporción CHO/L de las dietas (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad de enzimas digestivas de pejelagartos alimentados con las dietas experimentales después de 24 h de ayuno. Los valores son presentados como las medias $\pm$ SD, n=3.

Actividad (U mg proteína ⁻¹)	Proporción CHO/L en dietas				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
Proteasas	79.9 $\pm$ 14.4	73.8 $\pm$ 1.7	77.7 $\pm$ 12.3	77.6 $\pm$ 18.6	83.8 $\pm$ 4.5
Lipasas	527.6 $\pm$ 30.6	508.7 $\pm$ 80.8	580.9 $\pm$ 55	601.2 $\pm$ 114.9	622.8 $\pm$ 48.5
Amilasas	21.4 $\pm$ 11.5	24.3 $\pm$ 8.9	33.0 $\pm$ 13.6	42.9 $\pm$ 11.0	31.9 $\pm$ 10.4

3.5 Actividad de enzimas metabólicas

Las actividades enzimáticas fueron notablemente afectadas por las dietas experimentales, con excepción de la actividad piruvato quinasa (Tabla 6). Las actividades glucoquinasa (GK) y hexoquinasa (HK) se incrementaron conforme aumentó la proporción CHO/L de la dieta desde 0.75 a 2.10 pero disminuyó significativamente ($P < 0.05$) conforme la proporción CHO/L de la dieta fue mayor (2.52 y 4.63); mientras la tendencia opuesta fue observada en la actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). La actividad fructosa bifosfatasa (FBPasa) mostró el mismo patrón que la PEPCK pero la menor actividad enzimática la presentaron los peces alimentados con la proporción CHO/L de 2.53. La actividad piruvato quinasa no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$). La actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa fue significativamente afectada por las dietas experimentales, incrementando conforme aumentó la CHO/L ($P < 0.05$).

Tabla 6. Actividad de enzimas hepáticas de pejelagarto alimentados con las dietas experimentales después de 24 h de ayuno.

Actividad (U mg proteína ⁻¹)	Proporción CHO/L en dietas				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
<i>Enzimas glucolíticas</i>					
HK	0.81 ± 0.04 ^b	1.13 ± 0.34 ^b	1.97 ± 0.20 ^a	1.05 ± 0.06 ^b	1.82 ± 0.17 ^a
GK	0.15 ± 0.05 ^d	0.59 ± 0.27 ^{bc}	1.1 ± 0.05 ^a	0.69 ± 0.05 ^{ab}	0.19 ± 0.04 ^{cd}
PK	104.9 ± 19.6	99.4 ± 14.0	86.1 ± 3.7	89.9 ± 24.5	88.9 ± 5.6
<i>Enzimas gluconeogénicas</i>					
PEPCK	3.2 ± 0.13 ^a	3.3 ± 0.63 ^a	1.5 ± 0.42 ^b	2.5 ± 0.71 ^{ab}	2.8 ± 0.42 ^{ab}
FBPase	61.4 ± 1.7 ^a	56.1 ± 2.7 ^{ab}	53 ± 2.8 ^{ab}	47.7 ± 6.9 ^b	57.1 ± 3.7 ^{ab}
<i>Enzimas lipogénicas</i>					
G6PD	7.5 ± 0.05 ^b	8.3 ± 1.7 ^b	12.1 ± 0.8 ^a	9.7 ± 2.1 ^{ab}	12.5 ± 1.0 ^a

Los valores son presentados como medias ± SD, n=3. Las medias con diferentes superíndices en la misma fila son significativamente diferentes (P <0.05).

3.6 Efecto de la proporción CHO /L sobre el transcriptoma de hígados de pejelagarto

El análisis de expresión diferencial de genes (DEG) de los hígados de pejelagarto, a nivel de genes, mostró escasa diferencia a entre las tres dietas probadas, con solamente una decena de genes diferencialmente expresados. Además, no pudo observarse un patrón claro de agrupación entre las repeticiones de cada dieta (Figura 1).

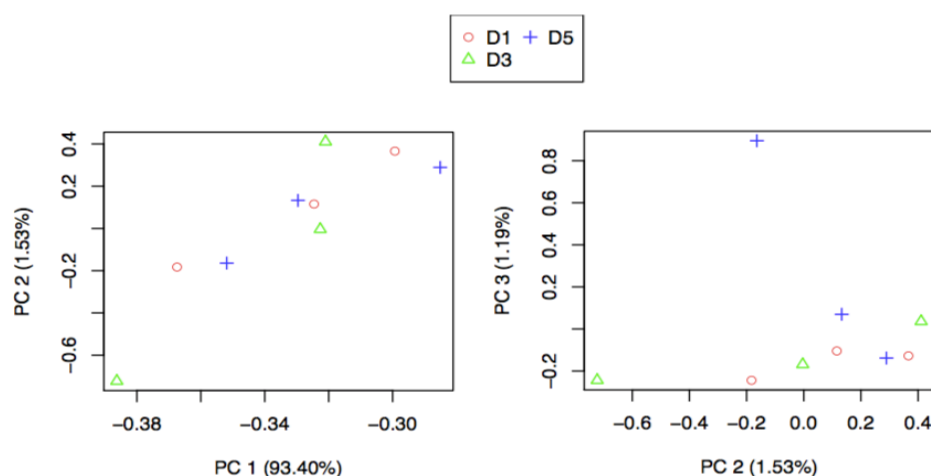


Figura 1. Análisis de componentes principales de genes diferencialmente expresados en los hígados de pejelagartos alimentados diferentes proporciones de CHO/L. n=3 peces por repetición

Guerrero-Zárate, R., Álvarez-González, C.A., Jesus-Contreras, R., Llera-Herrera, R., Méndez-Marín, O., Galaviz, M., López, L. 2019. Uso de Carbohidratos en Alimentos para Pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) y su Efecto en el Metabolismo Intermediario. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisiones en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp.1-37.

La mayor diferencia entre perfiles de expresión se encontró entre los peces que fueron alimentados con la dieta 1 contra los alimentados con la dieta 5 (38 genes expresados diferencialmente). Los grupos más homogéneos en cuanto a expresión fueron los de los peces alimentados con la dieta 3 contra la dieta 5 (6 genes expresados diferencialmente) (datos no mostrados). No obstante, cuando el análisis se realizó a nivel isoformas pudo observarse una mayor diferencia entre los perfiles de expresión (Figura 2).

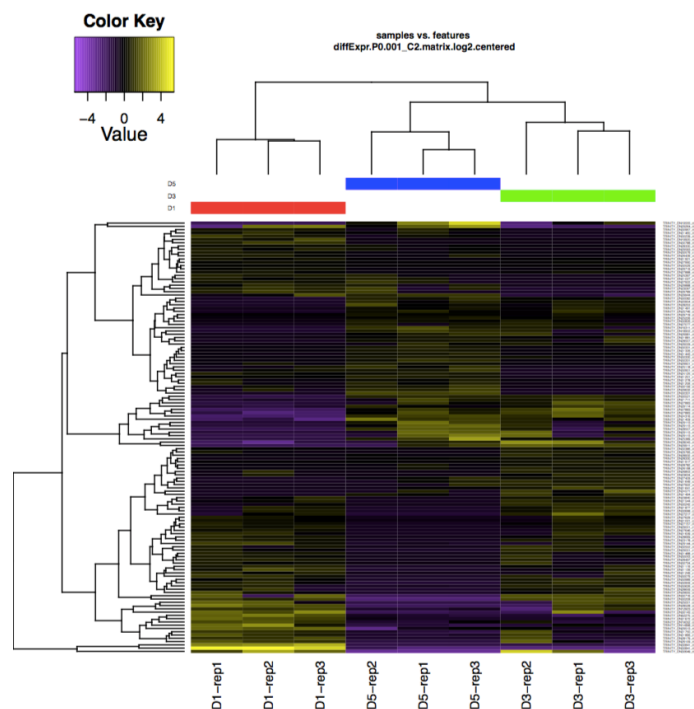


Figura 2. Heatmap de isoformas diferencialmente expresadas en los hígados de pejelagartos alimentados con diferentes proporciones de CHO/L. n=3 peces por repetición.

En los perfiles de expresión de los hígados de peces alimentados con la D1 vs D3 se observaron 46 genes expresados diferencialmente. Entre ellos destacan como implicados en el metabolismo de lípidos: el gen APOA4 (Apolipoproteína A-IV) sobreexpresado en peces alimentados con la D1 y ACACA-RAT (acetil-CoA carboxilasa 1), ACOD_CYPKA (Acil-CoA desaturasa) y ANGL8 isoformas 1, 2 y 3 (Proteína similar a la angiopoietina 8) sobreexpresados con la D3 (Tabla 7).

Tabla 7. Genes por isoforma diferencialmente expresados en D1 vs D3

Gene-ID	Clave	Nombre	logFC	logCP M	PValue	FDR
TRINITY_DN295 13_c0_g1_i5	APOA4	Apolipoprotein A- IV	2,76	9,12	2,27E-06	0,00097
TRINITY_DN278 83_c0_g2_i1	ANGL8_HUMA N	Angiopoietin-like protein 8	-3,62	6,27	2,94E-08	2,14E-05
TRINITY_DN278 83_c0_g2_i2	ANGL8_HUMA N	Angiopoietin-like protein 8	-3,63	3,48	5,23E-08	3,55E-05
TRINITY_DN278 83_c0_g2_i3	ANGL8_HUMA N	Angiopoietin-like protein 8	-4,00	5,28	4,12E-11	5,07E-08
TRINITY_DN305 21_c0_g1_i1	ACACA_RAT	Acetyl-CoA carboxylase 1	-4,53	3,79	5,25E-14	1,48E-10
TRINITY_DN274 09_c0_g1_i1	ACOD_CYPKA	Acyl-CoA desaturase	-8,74	1,23	1,01E-12	1,99E-09

Al comparar los hígados de los peces alimentados con la D3 vs D5, 34 genes fueron expresados diferencialmente (Tabla 8). Entre ellos destacan los siguientes por estar asociados al metabolismo de carbohidratos o lípidos: Con la D3 se sobreexpresaron los genes PLPL9_MOUSE (fosfolipasa A2 independiente de calcio de 85/88 KDa), CHKA_HUMAN (Colina quinasa alfa) y sobreexpresado con la dieta 3 HMCS1_CHICK (hidroximetilglutaril-CoA-sintasa).

Tabla 8. Genes por isoforma diferencialmente expresados en D3 vs D5.

Gene-ID	Clave	Nombre	logF C	logCP M	PValue	FDR
TRINITY_DN30 502_c0_g1_i4	PLPL9_MOU SE	85/88 kDa calcium- independent phospholipase A2	8.69	1.50	1.78E-08	1.83E-05
TRINITY_DN30 386_c0_g1_i5	CHKA_HUM AN	Choline kinase alpha	7.75	0.66	4.42E-08	4.11E-05
TRINITY_DN30 901_c0_g1_i3	HMCS1_CHI CK	Hydroxymethylglutaryl -CoA synthase	-6.38	-6.38	2.23619	7.08E-12

Mientras en la comparación de hígados entre la D1 vs D5 se observaron 68 genes distintos (Tabla 9). Entre ellos destacan por su participación en el metabolismo intermediario; sobreexpresados con la D5 ACACA-RAT (acetil-CoA carboxilasa 1), ELOV4_HUMAN isoformas 1, 2, 5, 12 (elongasa 4), ELOV2_HUMAN (elongasa 2), ANGL8 isoforma 3 (Proteína similar a la angiopoyetina 8), FAS_CHICK (ácido graso sintasa), ACOD_CYPKA (Acil-CoA desaturasa).

Tabla 9. Genes por isoforma diferencialmente expresados en D1 vs D5

Gene-ID	Clave	Nombre	logF C	logCPM	PValue	FDR
TRINITY_DN27 883_c0_g2_i3	ANGL8_HU MAN	Angiopoietin-like protein 8	-3.18	4.40	3.98E-08	2.19E-05
TRINITY_DN25 746_c0_g1_i1	FAS_CHICK	Fatty acid synthase	-4.29	1.59	1.03E-07	5.08E-05
TRINITY_DN30 521_c0_g1_i1	ACACA_RAT	Acetyl-CoA carboxylase 1	-4.64	3.80	1.89E-15	4.43E-12
TRINITY_DN27 409_c0_g1_i1	ACOD_CYPC A	Acyl-CoA desaturase	-8.41	0.88	2.17E-06	0.000605277
TRINITY_DN25 389_c0_g1_i1	ELOV2_HUM AN	Elongation of very long chain fatty acids protein 2	- 11.21	3.59	6.23E-10	5.55E-07
TRINITY_DN29 113_c0_g1_i2	ELOV4_HUM AN	Elongation of very long chain fatty acids protein 4	- 11.65	4.02	3.30E-13	6.87E-10
TRINITY_DN29 113_c0_g1_i12	ELOV4_HUM AN	Elongation of very long chain fatty acids protein 4	- 11.74	4.11	4.95E-08	2.65E-05
TRINITY_DN29 113_c0_g1_i5	ELOV4_HUM AN	Elongation of very long chain fatty acids protein 4	- 11.95	4.33	2.57E-11	4.01E-08
TRINITY_DN29 113_c0_g1_i1	ELOV4_HUM AN	Elongation of very long chain fatty acids protein 4	- 12.26	4.63	4.88E-07	0.000186635

3.7 Histología del hígado

El hígado de *A. tropicus* presenta células hepáticas (hepatocitos) cuyo arreglo, en general, muestra un núcleo con cromosomas plumosos, numerosos nucléolos basófilos, y citoplasma vacuolado acidófilo. Los hígados de los peces alimentados con la D1 presentan numerosos hepatocitos con un núcleo central basófilo, citoplasma acidófilo con pequeñas y escasas vacuolas (figura 3 d,g) en comparación con los alimentados con la D3 y D5. Los hepatocitos se encuentran arreglados en cordones hepáticos separados entre sí por un espacio o sinusoide, rodeando venas o arterias (Figura 3 a). En los peces alimentados con la D3 se observa un incremento en el tamaño de las vacuolas y los núcleos presenta un ligero desplazamiento a la periferia (Figura 3 e, h), es evidente el arreglo de los hepatocitos en cordones hepáticos (Figura 3b). Mientras que, en los peces alimentados con la D5, en todo el hígado se observan hepatocitos con vacuolas de mayor tamaño (Figura 3c), en comparación con los tratamientos D1 y D3, lo que generan cambios en la estructura de los cordones hepáticos. La vacuolización

Guerrero-Zárate, R., Álvarez-González, C.A., Jesus-Contreras, R., Llera-Herrera, R., Méndez-Marín, O., Galaviz, M., López, L. 2019. Uso de Carbohidratos en Alimentos para Pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) y su Efecto en el Metabolismo Intermediario. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisiones en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp.1-37.

del citoplasma de los hepatocitos provoca deformación celular y desplazamiento total del núcleo. Los hepatocitos vacuolados se asocian entre ellos formando una estructura de roseta, con menor presencia de núcleos picnóticos, los cuales en algunos casos están ausentes (Figura 3 f, i).

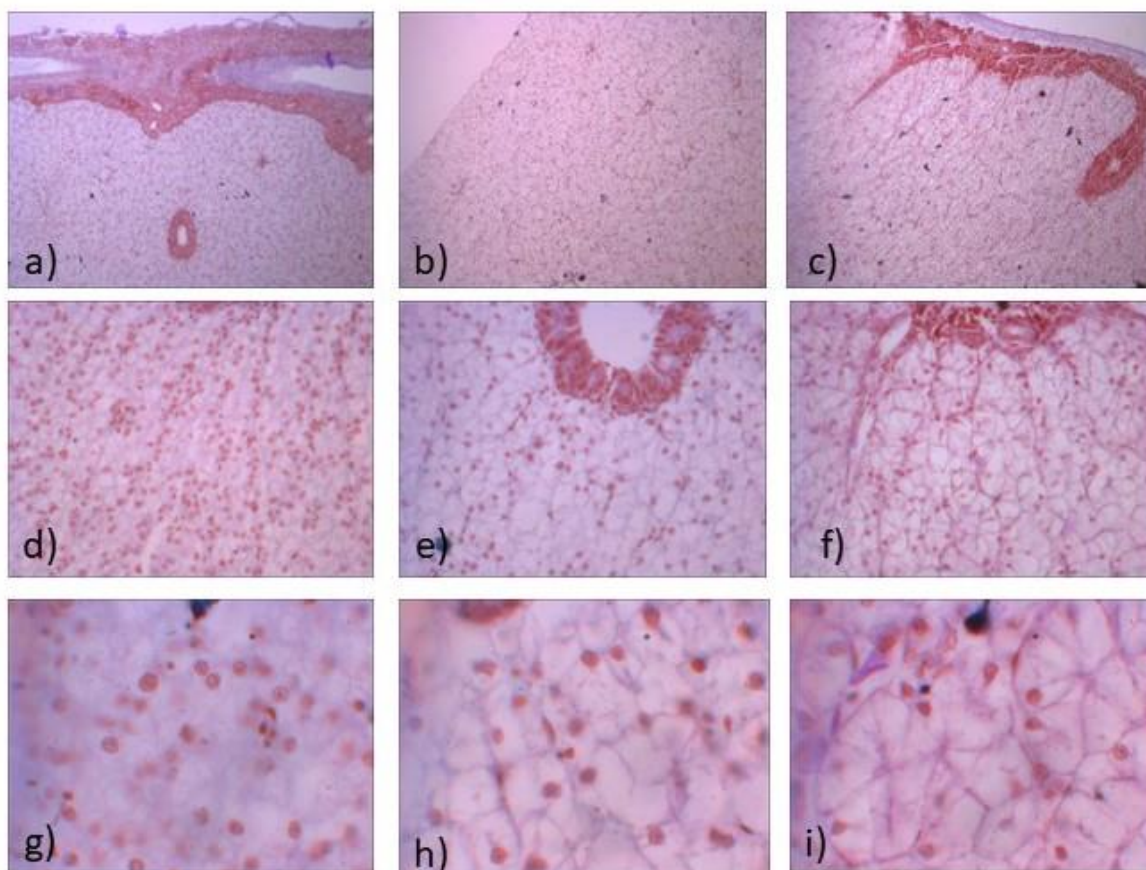


Figura 3. Fotomicrografías de secciones histológicas representativas de hígados de *A. tropicus* alimentados con la D1 (a,d,g), D2 (b,e,h) y D3 (c,f,i). Magnificación 10X (a,b,c), 40X (d,e,f) y 100X (g,h,i).

3.8 Curva de tolerancia a la glucosa

Los resultados de la curva de tolerancia a la glucosa muestran que existen diferencias significativas debidas a la dosis empleada ($P = 0.0020$) y al tiempo de exposición ($P = 0.0024$).

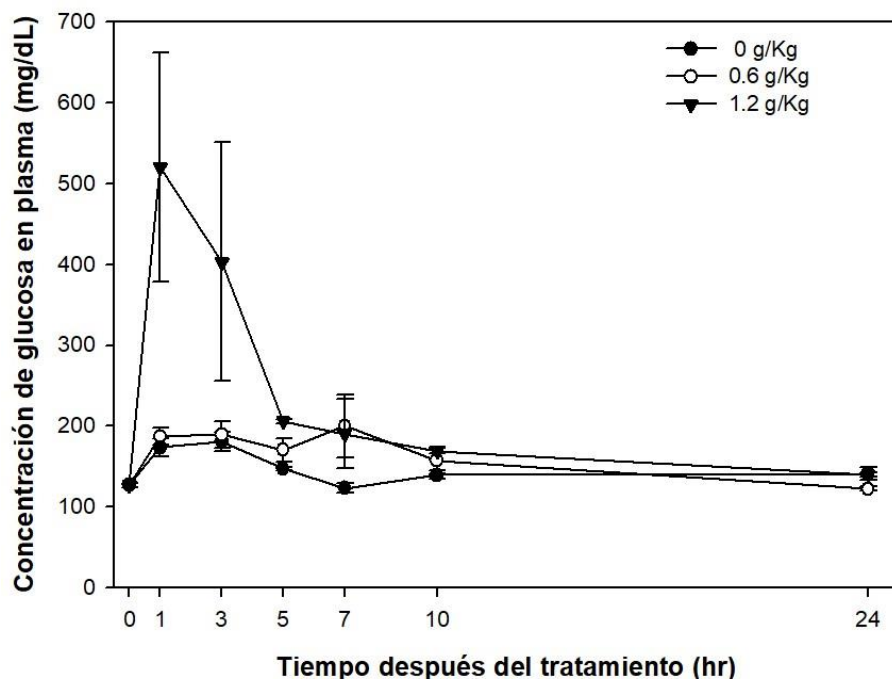


Figura 4. Curvas de tolerancia a la glucosa en *A. tropicus* después de la administración de glucosa intraperitoneal. Los valores son presentados como medias $\pm$ SD, n=3

Discusión

El pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) ha sido descrito como un especie carnívora en sus primeras etapas de vida (Reséndez & Salvadores, 1983; Frías-Quintana et al., 2015); sin embargo, nuestros resultado respecto a parámetros de crecimiento y rendimiento indican que sustituir lípidos por carbohidratos en sus dietas no afecta significativamente estos parámetros.

Es sabido que un alto aporte energético en la dieta disminuye el consumo de alimento, lo que tiene efectos negativos en el crecimiento debido a la reducción en el consumo de nutrientes, como las proteínas (Borba, Fracalossi and Pezzato, 2006). En la presente investigación, la energía bruta fue mayor conforme disminuyó la proporción CHO/L de las dietas, a pesar de ello los resultados no mostraron diferencias significativas respecto al consumo de alimento.

En el presente estudio, la sobrevivencia no fue afectada por las dietas experimentales, esta se mantuvo en un rango entre el 80 al 96%, lo cual coincide con estudios anteriores en el pejelagarto Frías-Quintana *et al.* (2016) quienes describieron una supervivencia del 97.8% y una disminución en el canibalismo cuando se alimentaron con dietas que contenían un 15% de almidón de maíz. Así mismo, Huerta-Ortiz *et al.* (2009) obtuvieron una supervivencia entre el 56 y 86% en un estudio acerca de la sustitución de aceite de pescado por aceites vegetales.

Por otro lado, el contenido de lípidos en el cuerpo en canal disminuyó significativamente con el incremento de la proporción CHO/L desde 2.10 a 4.63, lo que indica como es de esperarse en *A. tropicus* los lípidos tienen un papel primordial en la deposición de lípidos en comparación con los carbohidratos. Resultados similares han sido descritos en otras especies de peces tales como el lenguado senegales (*Solea senegalensis*) (Dias *et al.*, 2004), la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) (Gao *et al.*, 2010), el pez jundiá (*Rhamdia quelen*) (Moro *et al.*, 2010), el yellow croaker (*Larimichthys crocea*) (Zhou, Wang, Xie, Deng, & Zhou, 2016) y *Sardinella brasiliensis* (Sterzelecki *et al.*, 2017).

El contenido de proteína del canal no tuvo variaciones significativas, lo que coincide con la mayoría de los estudios relacionados con la inclusión de carbohidratos en la dieta. En los casos en los que se describió la modificación en el contenido de proteína corporal, en especies como en la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) (Ellis and Reigh, 1991), el barramundi (*Lates calcarifer*) (Catacutan and Coloso, 1997), *Megalobrama amblycephala* (Li *et al.*, 2013) y *Trachinotus ovatus* (Zhou *et al.*, 2015) los autores lo atribuyeron a la relación inversa entre el contenido de lípidos y proteínas cuando los datos son expresados como porcentaje (Ellis and Reigh, 1991).

El índice hepatosomático (HSI) de los peces alimentados con la proporción CHO/L de 2.10 fue significativamente mayor que el de los peces alimentados con las proporciones CHO/L de 0.75 y 4.63. Relacionado con esto, la composición proximal del hígado mostró una menor deposición de glicógeno hepático en los peces que recibieron la dieta libre de almidón de

maíz (dieta con proporción CHO/L de 0.75) con respecto a los peces que consumieron el resto de las dietas. Por el contrario, el nivel de lípidos en el hígado disminuyó conforme la proporción CHO/L se incrementó. Por lo tanto, el mayor HSI observado en los peces que fueron alimentados con la dieta con una proporción CHO/L de 2.10 mostró el efecto de la sinergia en la acumulación de lípidos y glucógeno en el hígado. Esto sugiere que el HSI tiende a incrementarse hacia la proporción CHO/L de 0.75 debido al menor contenido de glucógeno, mientras también disminuye hacia la proporción CHO/L de 4.63 debido a la menor acumulación de lípidos.

Un aspecto importante en la digestión de nutrientes es la actividad de las enzimas digestivas. Las proteasas, lipasas y amilasas son secretadas en respuesta al contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos en la dieta (Buddington and Krogh, 2004). En este contexto la actividad alfa-amilasa generalmente se correlaciona positivamente con el nivel de carbohidratos (Polakof *et al.*, 2012); al parecer la habilidad para secretar alfa-amilasa es más eficiente en especies herbívoras y omnívoras, mientras en especies carnívoras como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) su expresión no es eficiente, lo que puede provocar efectos adversos cuando se incorporan altos niveles de carbohidratos en su dieta (Krogh, Hemre and Mommsen, 2005). En el caso de la actividad lipasa relacionada con la inclusión de carbohidratos, la respuesta es variable. Especies tales como *C. idella* y *L. crocea* muestran un decremento en la actividad lipasa conforme la proporción CHO/L incrementa (Gao *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2016) mientras en *S. brasiliensis* la actividad tiende a incrementarse en relación con la proporción CHO/L (Sterzelecki *et al.*, 2017). Investigaciones previas en larvas de *A. tropicus* describen un incremento significativo de la actividad α -amylase conforme se incrementa la cantidad de carbohidratos dietarios (Frías-Quintana *et al.*, 2016, 2017). En la presente investigación se observó la misma tendencia, aunque no encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos aplicados.

El análisis de concentración de glucosa en plasma después de 24 h de ayuno no mostró diferencias significativas entre los pejelagartos alimentados con las dietas experimentales. En los peces, la duración e intensidad del pico de glucosa posprandial es especie-específico

y condiciona la tolerancia de cada especie a los carbohidratos (Moon, 2001). La mayoría de las especies carnívoras tienden a exhibir una prolongada hiperglicemia posprandial después de una comida rica en carbohidratos, hasta 40 h en el caso del salmón (Polakof *et al.*, 2012). Los resultados de la presente investigación muestran que el pejelagarto presenta la capacidad de metabolizar la glucosa más rápido que otros peces carnívoros (Polakof *et al.*, 2012). De acuerdo con la prueba de tolerancia a la glucosa, el nivel basal de glucosa en plasma es recuperado alrededor de las 10h posteriores a una inyección intraperitoneal de 1.2 g kg⁻¹ de dextrosa. Lo anterior, es sustentado también por el análisis de transcriptoma diferencial en el cual no se encontró una modificación significativa sobre los perfiles de expresión genética de los hígados de pejelagarto 24 h después de la última alimentación.

Los resultados de triglicéridos y colesterol en plasma fueron incrementados significativamente conforme disminuyo la CHO/L, esto coincide con lo que se ha reportado en *Sparus latus* (Hu *et al.*, 2007), *C. idella* (Gao *et al.*, 2010), *L. crocea* (Zhou *et al.*, 2016) y *Oreochromis niloticus* (Xie *et al.*, 2017). Los perfiles de los parámetros bioquímicos en plasma son reflejo de estado metabólico y fisiológico de los tejidos, especialmente del hígado. Por lo tanto, un incremento de triglicéridos y colesterol en plasma es atribuido al transporte activo en respuesta al alto nivel de lípidos en las dietas (Xie *et al.*, 2017). Respecto a esto, los perfiles de expresión genética mostraron que en los peces que consumieron la D1 (18.3 % de lípidos y 13.8 % de CHO) respecto a los que consumieron la dieta 3 (10.7% CHO y 22.5% lípidos) se sobreexpresó el gen APOA4, el cual codifica para la apolipoproteína A-IV. Hasta ahora se sabe que el incremento en la expresión de este gen en el hígado se da por condiciones que incrementen la acumulación de triacilglicéridos en los hepatocitos (esteatosis). La expresión del gen APOA4 mejora la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad unidas a triglicéridos (VLDL-TG) e incrementa el tamaño de partícula de las VLDL, de tal forma que se ha relacionado la expresión de este gen con la exportación de lípidos desde los hepatocitos como un mecanismo de defensa ante una acumulación excesiva de lípidos (Verhague *et al.*, 2013). Los resultados de ambos estudios sugieren que los pejelagartos alimentados con la D1 estaban consumiendo una dieta alta en grasas para sus

requerimientos e implementaron estrategias fisiológicas como defensa ante una excesiva acumulación de lípidos en los hepatocitos.

El hígado tiene un papel primordial en la regulación del metabolismo intermediario en respuesta al estado nutricional. Bajo condiciones aeróbicas la glucosa es catabolizada por medio de la glucólisis, el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones para producir ATP o por medio de la ruta de las pentosas fosfato genera poder reductor (NADP). El exceso de energía puede ser almacenado como glucógeno (glucogénesis) o lípidos (lipogénesis). En situación de ayuno, la pérdida de glucosa es satisfecha por la síntesis *de novo* a partir de piruvato, lactato, glicerol y algunos aminoácidos o por la degradación del glucógeno en glucosa (glucogenólisis) (Polakof *et al.*, 2012; Rui, 2014). Por ello, una adecuada regulación de estas rutas es necesaria para mantener la homeostasis de la glucosa. En los peces estos mecanismos son bien regulados en especies herbívoras tales como la carpa (*Cyprinus carpio*) (Shimeno, Kheyyali and Shikata, 1995) u omnívoros como la tilapia *O. niloticus* (Chen *et al.*, 2017). Sin embargo, en carnívoros como Sparus *aurata* (Enes *et al.*, 2011), la perca (*Perca fluviatilis*) (Borrebaek and Christophersen, 2000), la trucha (*O. mykiss*) (S Panserat *et al.*, 2001; S. Panserat *et al.*, 2001; Kirchner *et al.*, 2008), European seabass (*Dicentrarchus labrax*) (Enes *et al.*, 2006, 2011) y *L. crocea* (Zhou *et al.*, 2016), se ha mostrado una escasa inhibición de la gluconeogénesis hepática, tanto a nivel molecular como de actividad enzimática, al incluir carbohidratos en su dieta (Enes *et al.*, 2009). La ausencia de la inhibición de la gluconeogénesis inducida por carbohidratos es una hipótesis para la hiperglicemia posprandial y el pobre uso de los carbohidratos observada en peces carnívoros

En la presente investigación nuestros resultados muestran un incremento significativo en la actividad de enzimas clave en la ruta glucolítica (HK y GK) como respuesta a la inclusión entre 13.8 a 22.5% de carbohidratos en las dietas de *A. tropicus* (proporción CHO/L de 0.75 a 2.10) mientras que las enzimas gluconeogénicas (PEPCK y FBPase) disminuyeron significativamente su actividad en el mismo rango de inclusión de carbohidratos. Esto confirma una regulación eficiente de las rutas de la glucólisis y la gluconeogénesis en el pejelagarto. Sin embargo, una inclusión de almidón mayor al 25% (proporción CHO/L de

2.52) causa un incremento en la actividad de las enzimas gluconeogénicas y disminuye la actividad de las enzimas glucolíticas, lo que sugiere una pérdida en la regulación de las rutas metabólicas. En la trucha *O. mykiss* se ha descrito que esto se debe a una malformación de los hepatocitos debido a una excesiva acumulación de glucógeno hepático (Hemre, Mommsen and Krogdahl, 2002), esto coincide con las observaciones de malformaciones en los hepatocitos debidas a una excesiva vacuolización en los pejelagartos del presente estudio.

La piruvato quinasa (PK) es otra enzima clave de la ruta de la glucólisis, aunque se acepta que esta enzima está bajo regulación nutricional, en los peces su mecanismo de regulación aún es controversial (Enes *et al.*, 2009; Kamalam, Medale and Panserat, 2017). Se sabe que su actividad es afectada por el tipo de carbohidrato suministrado y por los periodos de inanición (Enes *et al.*, 2009). En el presente estudio la inclusión de hasta 29% de almidón de maíz pregelatinizado en las dietas de *A. tropicus* no tuvo un efecto significativo en la actividad PK, lo que coincide con estudios previos realizados en *O. mykiss* (Hilton and Atkinson, 1982; Fideu, Soler and Ruiz-Amil, 1983; Suarez *et al.*, 2002; Skiba-Cassy *et al.*, 2013), *S. senegalensis* (Dias *et al.*, 2004; Conde-Sieira, Soengas and Valente, 2015) y *S. aurata* (Enes *et al.*, 2008).

Por otro lado, aunque la lipogénesis no es una ruta directamente ligada al metabolismo de carbohidratos, en los tetrápodos tienen un papel importante en la homeostasis debido a que a través de ella el exceso de glucosa es convertida en ácidos grasos. La glucosa puede activar la lipogénesis al generar esqueletos de carbono o por generar poder reductor (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, NADPH), aunque los estudios en peces apuntan a que en este grupo es la segunda opción la que contribuye de forma predominante (Hemre, Mommsen and Krogdahl, 2002).

Investigaciones en la trucha arcoíris revelaron que el uso de metformina (un medicamento prescrito para la diabetes tipo 2) reduce la hiperglicemia posprandial como se ha observado en los humanos, pero no por la reducción de la gluconeogénesis hepática como era de esperarse, sino por la inducción de la lipogénesis hepática, lo que llevo a los autores a sugerir que en esta especie y en otros peces carnívoros la escasa lipogénesis puede explicar en parte

la hiperglicemia posprandial (Panserat *et al.*, 2009). Además, estudios con hepatocitos primarios de trucha demuestran que los aminoácidos son mas eficientes que los carbohidratos para la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de ácidos grasos (FAS, ACLY, ACC, ELOVL 2, ELOVL 5, G6PDH) (Dai *et al.*, 2015, 2016).

Nuestros resultados demuestran que en *A. tropicus* la actividad G6PDH (enzima que cataliza la primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato y genera NADPH) incrementa con la inclusión de carbohidratos en la dieta, indicando la generación de poder reductor que puede activar la lipogénesis. Aunado a ello, los resultados de expresión genética indican que la mayoría de los genes sobreexpresados en la D5, implicados en el metabolismo intermediario, están relacionados con la biosíntesis de lípidos.

Tal es el caso del gen ACACA, que codifica para la enzima acetil-Co carboxilasa la cual interviene en la primera reacción, considerada un paso limitante, de la biosíntesis de ácidos grasos catalizando la formación de malonil CoA a partir de acetil-CoA y bicarbonato (Mathews, Van Holde and Ahern, 2002). Continuando el proceso de biosíntesis, se encontró al gen FAS que codifica para el complejo multienzimático ácido graso sintasa, el cual cataliza la síntesis de ácidos grasos de cadena larga *de novo*, a partir de malonil-CoA y acetil CoA en presencia de NADPH. También se encontraron sobreexpresados los genes implicados en la desaturación y elongación de ácidos grasos (Mathews, Van Holde and Ahern, 2002). ACOD codifica para la enzima acil-CoA desaturasa que introduce el primer enlace doble en los ácidos grasos saturados, sintetizando de esta forma ácidos grasos monoinsaturados (Mathews, Van Holde and Ahern, 2002). Así mismo, se sobreexpresaron los genes ELOV2 y 4, que codifican para enzimas elongasas implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)(Monroig, Tocher and Filipe Castro, 2018). El pejelagarto cuenta con las enzimas requeridas para la síntesis y desaturación de ácidos grasos de novo a partir de carbohidratos y la elongación de ácidos grasos de cadena muy larga (VLC-PUFA).

En conclusión, aunque *A. tropicus* ha sido descrito como un pez carnívoro durante su primera etapa de desarrollo, nuestros resultados apuntan a que es posible incluir carbohidratos en sus

dietas (almidón de maíz pregelatinizado) en proporciones CHO/L de 0.75 a 4.63 por 45 días sin afectar parámetros de crecimiento, utilización de alimento, supervivencia y actividad de enzimas digestivas. Sin embargo, a nivel metabólico se aprecia que dietas ricas en lípidos inducen una mayor concentración de triglicéridos y glucosa en plasma y acumulación de lípidos en el hígado y el cuerpo en canal y ante ello se sobreexpresa el gen APOA4 en el hígado. Por otro lado, aunque después de 24 h de ayuno no se observa efecto de la proporción CHO/L de la dieta sobre la concentración de glucosa en plasma, la actividad de las enzimas HK y GK se incrementan significativamente en respuesta a la dieta mientras la actividad de la PEPCK y FBPasa muestra la tendencia opuesta, lo que demuestra que *A. tropicus* tiene la capacidad de metabolizar adecuadamente la glucosa. Así mismo, el incremento de la CHO/L favorece la acumulación de glucógeno hepático y la activación de la ruta de lipogénesis.

Agradecimientos

La autora agradece al PRODEP por la beca para sus estudios doctorales, al Programa Institucional de Superación Académica de la UJAT. Asimismo, al proyecto de Ciencia Básica del CONACyT “Estudio de la fisiología digestiva en larvas y juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) con base en técnicas histológicas, bioquímicas y moleculares” Clave CB-2016-01-282765 por el apoyo financiero para la realización de esta investigación.

Referencias

- Andoh, T. (2007) 'Amino acids are more important insulinotropins than glucose in a teleost fish, barfin flounder (*Verasper moseri*)', *General and Comparative Endocrinology*, 151, pp. 308–317. doi: 10.1016/j.ygcen.2007.01.015.
- Bolger, A. M., Lohse, M. and Usadel, B. (2014) 'Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data', *Bioinformatics*, 30(15), pp. 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Borba, M. R., Fracalossi, D. M. and Pezzato, L. E. (2006) 'Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid', *Aquaculture Nutrition*, 12(3), pp. 183–191. doi: 10.1111/j.1365-2095.2006.00401.x.
- Borrebaek, B. and Christophersen, B. (2000) 'Hepatic glucose phosphorylating activities in perch (*Perca fluviatilis*) after different dietary treatments', *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 125(3), pp. 387–393. doi: 10.1016/S0305-0491(99)00185-6.
- Borrebaek, B. and Waagbo, R. (1993) 'Adaptable hexokinase with low affinity for glucose in the liver of Atlantic salmon (*Salmo Salar*)', *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 106(4), pp. 833–836. doi: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90038-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90038-7).
- Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Buddington, R. K. and Kroghdahl, Å. (2004) 'Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract', *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 139(3), pp. 261–271. doi: 10.1016/j.cbpb.2004.09.007.
- Caseras, A. *et al.* (2000) 'Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*)', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1493, pp. 135–141. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00173-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00173-1).
- Caseras, A. *et al.* (2002) 'Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*)', *British Journal of Nutrition*, 88, pp. 607–614. doi: 10.1079/BJN2002701.
- Catacutan, M. R. and Coloso, R. M. (1997) 'Growth of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*, fed varying carbohydrate and lipid levels', *Aquaculture*, 149(1–2), pp. 137–144. doi: 10.1016/S0044-8486(96)01432-9.
- Chen, Y. J. *et al.* (2017) 'An evaluation of hepatic glucose metabolism at the transcription level for the omnivorous GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus* during postprandial nutritional status transition from anabolism to catabolism', *Aquaculture*. Elsevier B.V., 473, pp. 375–382. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.03.009.
- Conde-Sieira, M., Soengas, J. L. and Valente, L. M. P. (2015) 'Potential capacity of Senegalese sole (*Solea*

- senegalensis) to use carbohydrates: Metabolic responses to hypo- and hyper-glycaemia', *Aquaculture*. Elsevier B.V., 438, pp. 59–67. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.12.042.
- Dai, W. *et al.* (2015) 'Amino acids attenuate insulin action on gluconeogenesis and promote fatty acid biosynthesis via mTORC1 signaling pathway in trout hepatocytes', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(3), pp. 1084–1100. doi: 10.1159/000430281.
- Dai, W. *et al.* (2016) 'Hepatic fatty acid biosynthesis is more responsive to protein than carbohydrate in rainbow trout during acute stimulations', *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 310(1), pp. R74–R86. doi: 10.1152/ajpregu.00281.2015.
- Deng, D. F., Refstie, S. and Hung, S. S. O. (2001) 'Glycemic and glycosuric responses in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) after oral administration of simple and complex carbohydrates', *Aquaculture*, 199(1–2), pp. 107–117. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00515-4.
- Dias, J. *et al.* (2004) 'Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup)', *Aquaculture Research*, 35(12), pp. 1122–1130. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01135.x.
- Ellis, S. C. and Reigh, R. C. (1991) 'Effects of dietary lipid and carbohydrate levels on growth and body composition of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*', *Aquaculture*, 97(4), pp. 383–394. doi: 10.1016/0044-8486(91)90330-A.
- Enes, P. *et al.* (2006) 'Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles', *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 143(1), pp. 89–96. doi: 10.1016/j.cbpa.2005.10.027.
- Enes, P. *et al.* (2008) 'Growth performance and metabolic utilization of diets with native and waxy maize starch by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles', *Aquaculture*, 274(1), pp. 101–108. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.009.
- Enes, P. *et al.* (2009) 'Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish', *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(3), pp. 519–539. doi: 10.1007/s10695-008-9259-5.
- Enes, P. *et al.* (2011) 'Dietary carbohydrate utilization by European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus Aurata* L.) Juveniles', *Reviews in Fisheries Science*, 19(3), pp. 201–215. doi: 10.1080/10641262.2011.579363.
- Fideu, M. D., Soler, G. and Ruiz-Amil, M. (1983) 'Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.)', *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 74(4), pp. 795–799. doi: 10.1016/0305-0491(83)90148-7.
- Folch, J., Lees, M. and Sloan Stanley, G. (1957) 'A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues', *The Journal of Biological Chemistry*, 226, pp. 497–509. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2011.03.005.
- Frías-Quintana, C. *et al.* (2015) 'Development of digestive tract and enzyme activities during the early ontogeny

- of the tropical gar *Atractosteus tropicus*', *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(5), pp. 1075–1091. doi: 10.1007/s10695-015-0070-9.
- Frías-Quintana, C. *et al.* (2016) 'Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus tropicus*)', *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(2), pp. 517–528. doi: 10.1007/s10695-015-0156-4.
- Frías-Quintana, C. *et al.* (2017) 'Use of Potato Starch in Diets of Tropical Gar (*Atractosteus tropicus*, Gill 1863) Larvae', *Fishes*, 2(1), p. 3. doi: 10.3390/fishes2010003.
- Frías-Quintana, C., Álvarez-González, C. and Márquez-Couturier, G. (2010) 'Diseño de microdietas para el cultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus*, Gill 1863', *Universidad y Ciencia*, 26(2), pp. 265–282. Available at: <http://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v26n3/v26n3a6.pdf>.
- Furné, M. *et al.* (2005) 'Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study', *Aquaculture*, 250(1–2), pp. 391–398. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.05.017.
- Fynn-Aikins, K., Hung, S. S. O. and Hughes, S. G. (1993) 'Effects of feeding a high level of D-glucose on liver function in juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*)', *Fish Physiology and Biochemistry*, 12(4), pp. 317–325. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00004416>.
- Gao, W. *et al.* (2010) 'Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth performance, body composition, nutrient utilization and hepatic enzymes activities of herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)', *Aquaculture Nutrition*. Wiley Online Library, 16(3), pp. 327–333. doi: 10.1111/j.1365-2095.2009.00668.x.
- Gong, G. *et al.* (2015) 'The regulation of gluconeogenesis in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) affected later in life by a short-term high-glucose programming during early life', *Aquaculture*. Elsevier B.V., 436, pp. 127–136. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.10.044.
- Grabherr, M. *et al.* (2013) 'Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data', *Nature Biotechnology*, 29(7), pp. 644–652. doi: 10.1038/nbt.1883.Trinity.
- Guerrero-Zárate, R. *et al.* (2014) 'Partial characterization of digestive proteases in tropical gar *Atractosteus tropicus* juveniles', *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(4), pp. 1021–1029. doi: 10.1007/s10695-013-9902-7.
- Hemre, G.-I., Mommsen, T. P. and Krogdahl, A. (2002) 'Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes', *Aquaculture Nutrition*, 8(3), pp. 175–194. doi: 10.1046/j.1365-2095.2002.00200.x.
- Hilton, J. W. and Atkinson, J. L. (1982) 'Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increased levels of available carbohydrate in practical trout diets', 47, pp. 597–607. doi: <https://doi.org/10.1079/BJN19820071>.
- Hu, Y. -H. *et al.* (2007) 'Optimal dietary carbohydrate to lipid ratio for juvenile yellowfin seabream (*Sparus latus*)', *Aquaculture Nutrition*. Wiley Online Library, 13(4), pp. 291–297. doi: 10.1111/j.1365-

2095.2007.00476.x.

- Huerta-Ortiz, M. *et al.* (2009) 'Sustitución total de aceite de pescado con aceite vegetal en larvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus*', *Kuxulkab*, 15(28), pp. 51–58. doi: i.org/10.19136/kuxulkab.a15n28.443.
- Hung, S. O. *et al.* (1989) 'Ability of juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to utilize different carbohydrate sources', *J.Nutr.*, 119(October 1988), pp. 727–733.
- Kamalam, B., Medale, F. and Panserat, S. (2017) 'Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies', *Aquaculture*, 467, pp. 3–27. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.02.007.
- Keppler, D. and Decker, K. (1974) 'Glycogen determination with amyloglucosidase', *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 3, pp. 1127–1131.
- Kirchner, S. *et al.* (2008) 'The role of hepatic, renal and intestinal gluconeogenic enzymes in glucose homeostasis of juvenile rainbow trout', *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 178(3), pp. 429–438. doi: 10.1007/s00360-007-0235-7.
- Kirchner, S., Kaushik, S. and Panserat, S. (2003) 'Effect of partial substitution of dietary protein by a single gluconeogenic dispensable amino acid on hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)', *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 134(2), pp. 337–347. doi: 10.1016/S1095-6433(02)00267-2.
- Krogdahl, Å., Hemre, G. I. and Mommsen, T. P. (2005) 'Carbohydrates in fish nutrition: Digestion and absorption in postlarval stages', *Aquaculture Nutrition*, 11(2), pp. 103–122. doi: 10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x.
- Laiz-Carrión, R. *et al.* (2003) 'Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in gilthead seabream *Sparus aurata*', *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 298A(2), pp. 105–118. doi: 10.1002/jez.a.10256.
- Li, X. *et al.* (2013) 'Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth performance, body composition and glucose metabolism of fingerling blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*', *Aquaculture Nutrition*. Wiley Online Library, 19(5), pp. 701–708. doi: 10.1111/anu.12017.
- Márquez-Couturier, G. *et al.* (2006) 'Avances en la alimentación y nutrición del pejelagarto *Atractosteus tropicus*', in Cruz Suárez, L. *et al.* (eds) *Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. Monterrey, Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León, pp. 446–523. Available at: www.nutricionacuicola.uanl.mx/numeros/8/28Alvarez.pdf.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. and Ahern, K. G. (2002) *Bioquímica*. 3rd edn. España: Pearson Addison Wesley.
- Monroig, O., Tocher, D. and Filipe Castro, L. (2018) *Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis and Metabolism in Fish, Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-811230-4.00003-X.
- Moon, T. W. (2001) 'Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction?', *Comparative Biochemistry and*

- Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2–3), pp. 243–249. doi: 10.1016/S1096-4959(01)00316-5.
- Moro, G. *et al.* (2010) ‘Dietary non-protein energy sources: Growth, digestive enzyme activities and nutrient utilization by the catfish jundiá, *Rhamdia quelen*’, *Aquaculture Research*, 41(3), pp. 394–400. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02352.x.
- Panserat, S., Médale, C., *et al.* (2000) ‘Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp’, *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278, pp. 1164–1170.
- Panserat, S., Médale, F., *et al.* (2000) ‘Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)’¹¹The Genbank accession number for the rainbow trout G6Pase sequence is AF120150.’, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(1), pp. 22–29. doi: 10.1016/S0955-2863(99)00067-4.
- Panserat, S. *et al.* (2001) ‘Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose’, *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 128(2), pp. 275–283. doi: 10.1016/S1096-4959(00)00322-5.
- Panserat, S. *et al.* (2001) ‘Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)’, *Journal of Experimental Biology*, 204(2), pp. 359–365. Available at: <http://jeb.biologists.org/content/204/2/359>.
- Panserat, S. *et al.* (2009) ‘Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: a link with the induction of hepatic lipogenic capacities?’, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(3), pp. R707–R715. doi: 10.1152/ajpregu.00120.2009.
- Petrescu, I. *et al.* (1979) ‘Determination of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity with deoxyguanosine 5'-diphosphate as nucleotide substrate’, *Analytical Biochemistry*, 96(2), pp. 279–281. doi: 10.1016/0003-2697(79)90582-7.
- Plisetskaya, E. *et al.* (1991) ‘Effects of injected and dietary arginine on plasma insulin levels and growth of pacific salmo and rainbow trout’, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 98A(1), pp. 165–170. doi: [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(91\)90595-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90595-4).
- Polakof, S. *et al.* (2012) ‘Glucose metabolism in fish: A review’, *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182(8), pp. 1015–1045. doi: 10.1007/s00360-012-0658-7.
- Polakof, S., Míguez, J. M. and Soengas, J. L. (2008) ‘Dietary carbohydrates induce changes in glucosensing capacity and food intake of rainbow trout.’, *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 295(2), pp. R478–89. doi: 10.1152/ajpregu.00176.2008.
- Polakof, S., Mommsen, T. P. and Soengas, J. L. (2011) ‘Glucosensing and glucose homeostasis: From fish to

- mammals', *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Inc., 160(4), pp. 123–149. doi: 10.1016/j.cbpb.2011.07.006.
- Polakof, S. and Panserat, S. (2016) 'How Tom Moon's research highlighted the question of glucose tolerance in carnivorous fish', *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Inc., 199, pp. 43–49. doi: 10.1016/j.cbpb.2015.11.001.
- Polakof, S., Skiba-Cassy, S. and Panserat, S. (2009) 'Glucose homeostasis is impaired by a paradoxical interaction between metformin and insulin in carnivorous rainbow trout', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology*, 297, pp. R1769–R1776. doi: 10.1152/ajpregu.00369.2009.
- Reséndez, A. and Salvadores, M. (1983) 'Contribución al conocimiento de la biología del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) y la tenguayaca *Petenia splendida* (Günther) del estado de Tabasco', *Biotica*, 8(4), pp. 413–426.
- Rio, D. C. *et al.* (2010) 'Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent)', *Cold Spring Harbor Protocols*, 5(6), pp. 1–4. doi: 10.1101/pdb.prot5439.
- Robyt, J. F. and Whelan, W. J. (1968) 'The β -amylase', in Radley, J. (ed.) *Starch and its derivatives*. London: Chapman and Hall, pp. 477–497.
- Rui, L. (2014) 'Energy Metabolism in the Liver', *Comprehensive Physiology*, 4(1), pp. 177–197. doi: 10.1002/cphy.c130024.Energy.
- Sangiao-Alvarellos, S. *et al.* (2003) 'Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology*, 285(4), pp. R897–R907. doi: 10.1152/ajpregu.00161.2003.
- Shimeno, S., Kheyyali, D. and Shikata, T. (1995) 'Metabolic response to dietary carbohydrate to protein ratios in carp', *Fisheries Science*, 61(2), pp. 277–281. doi: <https://doi.org/10.2331/fishsci.61.277>.
- Shuyan, M. *et al.* (2016) 'Effects of Dietary Carbohydrate-to-Lipid Ratio on the Growth Performance and Feed Utilization of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus*)', *J. Ocean Univ. China (Oceanic and Coastal Sea Research)*, 15(4), pp. 1672–5182. doi: 10.1007/s11802-016-2934-8.
- Skiba-Cassy, S. *et al.* (2013) 'Apparent low ability of liver and muscle to adapt to variation of dietary carbohydrate:protein ratio in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)', *British Journal of Nutrition*, 109(8), pp. 1359–1372. doi: 10.1017/S0007114512003352.
- Sørensen, M. (2012) 'A review of the effects of ingredient composition and processing conditions on the physical qualities of extruded high-energy fish feed as measured by prevailing methods', *Aquaculture Nutrition*, 18(3), pp. 233–248. doi: 10.1111/j.1365-2095.2011.00924.x.
- Sterzelecki, F. C. *et al.* (2017) 'Effect of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth, digestive enzyme and blood metabolites of juvenile Brazilian sardines, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879)', *Aquaculture Research*, 48(9), pp. 5111–5121. doi: 10.1111/are.13330.
- Stone, D. A. J. (2003) 'Dietary carbohydrate utilization by fish', *Reviews in Fisheries Science*, 11(4), pp. 337–

369. doi: 10.1080/10641260390260884.
- Suarez, M. D. *et al.* (2002) 'Metabolic effects of changes in the dietary protein: carbohydrate ratio in eel (*Angilla anguilla*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*)', *Aquaculture International*, 10(2), pp. 143–156. doi: 10.1023/A:1021371104839.
- Thivend, P., Mercier, C. and Guilbot, A. (1972) 'Determination of starch with glucoamylase', in Whistler, R. and Bemiller, J. (eds) *General Carbohydrate Method*. New York, USA: Academic Press, pp. 100–105. doi: 10.1016/b978-0-12-746206-6.50021-7.
- Torfi Mozanzadeh, M. *et al.* (2017) 'Optimal dietary carbohydrate-to-lipid ratios for silvery-black porgy (*Sparidentex hasta*) juveniles', *Aquaculture Nutrition*, 23(3), pp. 470–483. doi: 10.1111/anu.12415.
- Tranulis, M. A. *et al.* (1996) 'A glucokinase-like enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*)', *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 114(1), pp. 35–39. doi: 10.1016/0305-0491(95)02119-1.
- Verhague, M. A. *et al.* (2013) 'Apolipoprotein A-IV expression in mouse liver enhances triglyceride secretion and reduces hepatic lipid content by promoting very low density lipoprotein particle expansion', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(11), pp. 2501–2508. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301948.
- Versaw, W. K. *et al.* (1989) 'An improved calorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry Milk', *Journal of Food Science*, 54(6), pp. 232–254. doi: 10.1111/j.1365-2621.1989.tb05159.x.
- Walter, H. (1984) 'Proteinases: Methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates', in Bergmeyer, H. J. (ed.) *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 5. Verlag Chemie. Weinham, pp. 270–277.
- William Horwitz (2000) *Official methods of analysis of AOAC International*. 17th edn, Association of Official Analytical Chemists. 17th edn. Gaithersburg, MD, USA.
- Wilson, R. P. (1994) 'Utilization of dietary carbohydrate by fish', *Aquaculture*, 124(1–4), pp. 67–80. doi: 10.1016/0044-8486(94)90363-8.
- Xie, D. *et al.* (2017) 'Effects of dietary carbohydrate and lipid levels on growth and hepatic lipid deposition of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*', *Aquaculture*. Elsevier, 479, pp. 696–703. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.07.013.
- Zhou, C. *et al.* (2015) 'Effect of dietary carbohydrate levels on growth performance, body composition, intestinal and hepatic enzyme activities, and growth hormone gene expression of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*', *Aquaculture*. Elsevier, 437, pp. 390–397. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.12.016.
- Zhou, P. *et al.* (2016) 'Effects of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth performance, digestive enzyme and hepatic carbohydrate metabolic enzyme activities of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)', *Aquaculture*. Elsevier B.V., 452, pp. 45–51. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.10.010.

Worldwide Research Advances in Alternate Protein-Based Feedstuffs for Cobia (*Rachycentron canadum*) Diets

Uriel Rodríguez-Estrada^{a,b*}, Carlos Alfonso Alvarez-González^b, Emyr Peña-Marín^{a,b},
Susana Camarillo-Coop^b, Rafael Martínez-García^b.

^aCátedra CONACYT (National Council of Science and Technology of Mexico Federal Government), Insurgentes sur 1582, Colonia Crédito Constructor, ZIP 03940, Delegación Benito Juárez, México City, México.

^bLaboratory of Tropical Aquaculture, DACBIOL (Academic Division of Biological Sciences) – UJAT (Juarez Autonomous University of Tabasco). Villahermosa-Cárdenas road km 0.5, ZIP: 86150, Villahermosa, Tabasco, México.

*E-mail: rodriguez_estrada_uriel@yahoo.com

Abstract

Cobia (*Rachycentron canadum*) is an important species for worldwide warm-water aquaculture because of its several desirable traits, such as rapid growth rate, good flesh quality and tolerance to variations in temperature and salinity. Cobia research has been recorded from a number of countries around the planet. This species has been exhaustively investigated in several aspects including nutrition & feeding. Cobia is a carnivorous species which requires feeds formulated with fishmeal as main protein source which significantly increases feed costs. Numerous studies have been focused in alternate protein-based feedstuffs (of different origin: plant, animal and single-cell) replacing fish meal in cobia diets. Among plant feedstuffs, soy bean meal (SBM) is the most studied. While rapeseed meal (RM) and corn gluten meal (CGM) have been less investigated. Investigations on alternate animal feedstuffs (shrimp protein hydrolysates – SPH –, shrimp waste meal – SWM –, fish silage – FS –, crab silage – CS –, poultry by-products meal – PBM –, blood meal – BM –, meat & bone meal – MBM –, and feather meal – FthM –), are limited. Similarly, single-cell protein meal (SCPM) feedstuffs for cobia have been modestly investigated. In present manuscript we illustrate the updated research related to worldwide advances in alternate feedstuffs (plant, animal and single-cell) for cobia feeds. Further studies in alternate feed ingredients choice, cost and palatability will assist in maximizing culture production while minimizing costs, for a sustainable cobia aquaculture. Present manuscript is intended to provide useful information not only for academy related professionals (researchers, professors, students) but also for aquaculture industry related personnel (farmers, technicians, and feed producers).

Keywords: plant feedstuffs, animal feedstuffs, unicellular feedstuffs, fish meal replacement, cobia diets.

Introduction

Cobia (*Rachycentron canadum*) is one of the most suitable candidates for warm, open-water marine fish aquaculture in the world (Liao, Huang, Tsai, Hsueh, Chang, & Leano, 2004). It has gained popularity for mariculture because of its desirable traits, such as rapid growth rate (up to 10 kg in 1 year), good flesh quality, adaptation, and tolerance to variations in temperature and salinity (Nhu, Nguyen, Le, Tran, Sorgeloos, Dierckens, Reinertsen, Kjorsvik, & Svennevig 2011). Cobia is a migratory pelagic fish that occurs in tropical and subtropical seas of the world, except in the central and eastern Pacific Ocean. It is fished both commercially and recreationally. Commercially, they are usually caught incidentally in hook / line and net fisheries. In the United States, which ranks behind Pakistan, Mexico, and the Philippines, in commercial production of cobia, recreational landings exceed commercial landings by more than ten-fold (Meyer and Franks, 1996).

Commercial cobia aquaculture from hatchery-produced seed stock began in the late 1990s in Taiwan in seawater ponds and small sea cages. Now it is the main farmed marine fish in that country, occupying 80% of the sea cages. Extensive cultivation in China and Taiwan, represents higher revenues. Taiwanese grow-out of cobia seems achieving relatively good results with the lowest production costs (72.89NT\$/kg live weight) (Liao *et al.*, 2004). Mainland China (at least Hainan and Fujian) is producing commercial quantities. Other provinces (Lingao, Sanya, Lingshui, Wenchang, Yangpu, Guangdong) report smaller but significant volumes (Cheng-Ting, Sha, Fan-Hua, & Shi-Mu 2011). Similarly, a steady commercial cobia farming has started in Philippines and Vietnam. In general, small scale farming in South East Asia has experienced a significant progress. Vietnam is the third cobia producer country (hatchery and intensive controlled cobia fry production) (Nhu *et al.*, 2011). Other countries such as USA and Australia have recorded significant production of cobia. Universities and research institutes of USA reported, a constant production of cobia eggs and juveniles. Grow-out production of cobia in cages is ongoing or has occurred in the Bahamas, Belize, Dominican Republic, Brazil and Puerto Rico, India and Ecuador. Statistics registered

world production of more than 43,000 metric ton (2013) equivalent to USD 74.7 million, with potential to grow (Rodríguez-Estrada, Yasumaru, Tacon, & Lemos 2015).

Cobia has been studied since 1975. The first investigation on this specie was reported in North Caroline were a collection of wild caught cobia eggs was conducted (Shaffer & Nakamura, 1989). Subsequent researches studied spawning, fry production and grow-out of juveniles in near shore cage systems (Arnold, Kaiser, & Holt 2002). Other investigations have been conducted in different aspects such as general biology and fisheries (Aliabadi, Gilkolaei, Savari, Zolgharnein, & Nabavi 2008; Arendt, Olney, & Lucy 2001; Atwood, Young, Tomasso, & Smith 2004), farming systems (Benetti, O'Hanlon, Rivera, Welch, Maxey, and Orhun 2010; Colburn, Walker, Berlinsky, & Nardi 2008; Liu, Hsia, & Huang 2006), diseases and health (Bullard & Overstreet, 2006; Warren, Orélis-Ribeiro, Ruiz, Dang, Arias, & Bullard 2017), genetics and reproduction (Faulk and Holt, 2008; Gopakumar, Nazar, Tamilmani, Sakthivel, Kalidas, Ramamoorthy, Palanichamy, Maharshi, Rao, & Rao 2011), processing and storage (Chow & Yang, 2011; Mach & Nortvedt, 2013), economics and marketing (Miao, Jen, Huang, & Hu 2009; Huang, Miao, Nan, & Jung 2011) and nutrition and feeding (Bor-Shing and Chen, 2004; Chi, Tan, Dong, Yang, Liu, Xu, & Huang, 2011). From the nutritional point of view, cobia has been studied in different aspects: natural food sources and feeding habits (Arendt *et al.*, 2001; Darracot, 1977), nutrient requirements (Chi *et al.*, 2011; Chou, Su, & Chen, 2001), enzymatic ontogeny and larval feeding (Faulk, Bennghoff, and Holt, 2007; Chu, Ye, Song, Shi, & Chen, 2005), digestive physiology (Cavalheiro-Araújo, Masaaki-Honji, Nishioka-Rombenso, Brambila-de Souza, Henrique-de Mello, Silva-Hilsdorf, & Guimaraes-Moreira, 2019; Ding, Li, Huang, Yi, and Xu, 2016), dietary manipulation and feeding regimes (Chuang, Lin, & Shiau, 2007; Costa-Bomfim, Pessoa, Oliveira, Farias, Domngues, Hamilton, & Cavalli, 2014), additives (Bor-Shing and Chen, 2004; Chang C.F., Yang J.H., Chou R.L., Her B.Y., Chang, Hsu, and Chen, 2008), feed formulations (Xu, Zheng, & Ding, 2005; Cavalli, & Hamilton S., 2009) and alternate feedstuffs (Bor-Shing, & Chen, 2007; Chen, 2005).

Present manuscript presents the progress of worldwide research efforts on alternate protein feedstuffs, examining different studies using plant, animal, and single-cell feedstuffs that have been tested in cobia diets.

1. Marine feed sources limitations

Cobia is a carnivorous pelagic fish that displays good growth and accepts commercially available diets. At present, commercial cobia feeds are based on those of similar marine fish achieving acceptable growth and FCRs ranging from 1.5 to 1.8 (Rodríguez Estrada, 2018). Diets for farmed carnivorous and marine finfish have primarily based on marine sources specifically low value pelagic fish species that have traditionally been major feed ingredients. In Asia, adult carnivorous species (such as: groupers, Asian seabass, cobia, snappers, tuna) are fed with fresh trash fish. However, efforts in the development and use of extruded feeds continue. Worldwide, pelleted feeds have been regularly based on fish meal (FM) and fish oil (FO), obtained from animal feed-grade fisheries industry targeting small pelagic species such as: anchovies, sardines, herring, and mackerel. However, decreased in fisheries stocks and high price of fish meal have made it hard to meet the aquaculture consumption of this industry. Over the past 30 years around 20 to 25 million tons (Mt) of feed fish have been caught manually. Notwithstanding this enormous pressure, there is an increased competition for direct human consumption (Chou, Her, Wang, Wu, & Chen, 2004). In addition, environmental effects and human activities (coastal and marine) have a severe impact in wild fish populations. There are other concerns related to risks associated with food and dietary habits of fish used for producing FM. Some of them are related to the use of formulated aquaculture feeds, because of contaminants present in feed raw materials such as heavy metals and persistent organic pollutants (POP). As a consequence, there are limited supply, increasing prices, and environmental pressures of marine feed sources which leads to explore research on sustainable sources to supply nutritional demands of farmed fish organisms in order to allow aquaculture expansion (Tacon and Metian, 2008).

2. Alternate protein feedstuffs

Protein-based feedstuffs for aquaculture diets are the single most important and expensive dietary component, mainly for carnivorous and marine fish which tends to have higher dietary protein requirements than freshwater fish. Until recently, FM was the major dietary protein source (between 20-60%) of fish diets (Mo, Lau, Kwok, & Wong, 2016). FM has excellent nutritional profiles. Furthermore, it is highly digestible and contains high levels of most essential amino acids. FM also has numerous essential nutrients, such as n-3 LC PUFA and minerals, and provides other elements. It has been demonstrated that economical feeds can be formulated with low levels of FM and containing an array of supplements. Hence, dietary requirements of marine farm fish can be met by sources other than FM, including terrestrial animal products, plant meals and single-cell protein (Glencross, Booth, and Allan, 2007). Research has demonstrated that production of FM-free feeds requires the use of previously processed and expensive ingredients (soy protein concentrate, canola protein concentrate, fermented plant meals terrestrial animal hydrolysates, feed attractants, amino acids). Traditionally, diets containing alternate ingredients are more expensive than diets containing regular FM. However, an increase of FM diets coupled with production of feed-grade protein concentrates, changing the price constraints formerly related to the use of food grade protein concentrates. The use of diets formulated with small amount of FM in grower feeds for marine fish appears to make profitable and sustainable. Until now, a variety of protein sources have been utilized in feed formulations for aquatic animals. Therefore, the current tendency is to use alternate protein-based feedstuffs in diets for aquacultured animals.

3. Effects of alternate protein feedstuffs in marine fish

Fish meal levels in diets for aquatic organisms have dramatically decreased in the past decade. FM substitution in marine fish diets is a greater challenge than in freshwater fish. There are studies, indicating that FM has been replaced by alternate protein meals without deleterious effects on growth performance, nutrient utilization and health of salmon fish (Olsen, Soutana, Langmyhr, Mundheim, Ringo, Melle, Malde, & Hemre, 2006; Stengerg,

Holen, Piemontese, Liland, Lock, Espe, & Belghit, 2019). In contrast, complete replacement of FM with maize gluten and soy protein concentrate significantly reduced feed intake and growth of European sea bass (Dias, 1999). Similarly, slight growth reductions were recorded in a 12-week trial when fish was fed diets containing 50-75% of plant protein ingredient and a 30% of complete replacement of FM (Gómez-Requeni, Mingarro, Caldach-Giner, Médale, Martin, Houlihan, Kaushik, & Pérez-Sánchez, 2004). However, turbot fed diets formulated with a mixture of lupin, wheat and maize gluten with supplementary crystalline amino acids, growth rate was only compromised with 90-100% replacement (Fournier, Huelvan, & Debruyeres 2004). Other study with marine fish (sea bass) demonstrated that feeding this fish species with up to 98% of plant-based protein showed no reduction in voluntary feed intake or growth over 12-week period (Kaushik, Covés, Dutto, & Blanc, 2004).

Nutrient deficiencies (e.g. taurine, cholesterol, phospholipids, among others), and differences in digestibility are the most important factors affecting effectiveness of alternate protein-based feedstuffs in fish diets. Most economical alternative ingredients (e.g. soybean meal, corn gluten meal, canola meal, meat and bone meal, feather meal) have significant limitations and cannot be used individually at very high levels in the diets of most fish species. Therefore, formulating successful cost-effective feeds with replacement of fish meal by alternate protein-based feedstuffs, requires not only the use of combinations of economical ingredients and a complete understanding of the nutrient requirement of the animal, but also several other, less well defined factors, including tolerance to anti-nutritional factors, interactions between nutrients, and palatability of finished feed (NRC 2011).

4. Plant protein feedstuffs

Various plant protein sources are commonly used in aquaculture feeds, including meals from oil seeds (soybean, rapeseed/canola, sunflower, cottonseed), grains (wheat and corn glutes) and legumes (peas, beans, peanut, and lupins). There are two main factors to consider in formulating feeds with high levels of plant meals: energy density, as some meals have high carbohydrate content (non-starch polysaccharides being the main issue) that is of little nutritional value for carnivorous species, and amino acid content, because some essential

amino acids such as lysine and methionine, are generally deficient in plant protein sources (Gatlin, Barrows, Brown, Dabrowsky, Gaylord, Hardy, Herman, Hu, Krogdahl, Nelson, Overturf, Rust, Sealey, Skonberg, Souza, Stone, Wilson, & Wertele 2007). Other disadvantage of plant feedstuffs is the presence of anti-nutrients including protease inhibitors, lectins, saponins, and phytic acid (Madsen and Brinch-Pedersen, 2016). Table 1, presents a summary of plant protein-based feedstuffs replacing FM in cobia diets.

Table 1. Summary of studies related to the use of plant protein-based feedstuffs replacing FM in cobia diets.

Feedstuff	Pre-treatment / form	Additional ingredients	Replacement levels used	Parameters studied	Optimum replacement level suggested	Reference
SBM	Hexane extracted	-----	10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%	Growth, nutrient utilization, muscle lipid, muscle threonine and histidine	40%	Chou <i>et al.</i> , 2004
	Untreated	-----	0%, 5%, 10%, 20%, 30%	Growth, feed utilization	< 10%	Wang <i>et al.</i> , 2005
	Untreated	L-methionine, L-proline, betain hydrochloride	20%, 60%, 80%, 100%	Survival, feed intake, growth, nutrient utilization	20%	Bor-Shing <i>et al.</i> , 2007
	Protein concentrate	Mannan oligosaccharide, nucleotide rich extract, marine worm meal	50%, 75%, 100%	Weight gain, feed efficiency, survival	100%	Salze <i>et al.</i> , 2010
	Solvent extracted, fermented, de-antinutrient, concentrate	-----	20%, 40%	Growth, nutrient utilization	20%-40% (Solvent extracted / fermented soybean meal)	Hsu <i>et al.</i> , 2005
	Nativa™, regular commodity (de-hulled, defatted, roasted and solvent extracted)	-----	Navita™ (38% & 45%) / Regular commodity soybean meal (28% and 32%)	Apparent digestibility coefficients, nutrient utilization, visceral somatic and hepatosomatic indexes, and muscle ratio.	45% (Navita™)	Suárez <i>et al.</i> , 2013
	Defatted	-----	0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%	Growth	40%	Zhou <i>et al.</i> , 2005
RM	3010 Solvent extracted / 3032 cold press cake meal	-----	3010 (50%, 60%, 70%) / 3032 (40%, 50, 60%)	Growth, nutrient efficiency	3010 (50%) / 3032 (40%)	Watson <i>et al.</i> , 2014
	Untreated	-----	5%, 10%, 15%	Growth	10%	Huang and Liao, 2005
	Untreated	-----	0%, 12.5%, 37.5%, 100%	Growth, feed intake, survival, digestibility, protein metabolism in relation to gene expression	12.50%	Luo <i>et al.</i> , 2012
CGM	Untreated	-----	10%	Growth, survival, whole body proximate composition	10%	Zhou <i>et al.</i> , 2012
	Untreated	-----	0%, 17.5%, 35%, 52.5%, 70%	Fish growth, whole body composition and protein metabolism in relation to gene expression	52.50%	Luo <i>et al.</i> , 2013
	Untreated	-----	70% (reference diet) + 30% of CGM	apparent digestibility coefficients	Not determined. However 30% of CGM present similar digestibilities compared to animal protein meals	Zhou <i>et al.</i> , 2004

SBM = Soybean meal
RM = Rapeseed meal
CGM = Corn gluten meal

4.1 Soybean meal (SBM)

Soybean meal (SBM) represents two-thirds of the total world output of protein feedstuffs, including all the major oil meals and fish meal. Worldwide, many animal farmers are looking for ways to use common SBM in diet formulations in order to lower feed costs. SBM is considered as the most nutritive plant ingredient widely used as terrestrial animal and fish feed ingredient. Among plant protein ingredients, SBM present an excellent amino acid profile. Other features that make this meal highly efficient as protein source is its resistance to oxidation and spoilage. SBM has been widely researched and used in practical diets for aquatic organisms. Growth and nutrient efficiency reduction in organisms fed diets with high levels of SBM may be attained to the present of certain anti-nutritional factors (ANF's) (Oil World, 2015).

There are numerous studies reporting the use of soy protein as FM replacement in diet formulations for cobia. Correct supplementation levels of soy-protein in diets without compromising fish performance is fundamental. To this respect, several studies have been published. Chou *et al.* (2004), conducted an 8 week feeding trial with cobia to determine the amount of SBM that can replace fish meal in formulated diets without reducing performance of cobia. In this study, fish meal was replaced by soybean protein at 10%, 20%, 30%, 40%, 50% and 60%. Detrimental effects on growth performance were obvious when half of the FM protein was replaced by SBM. Results indicated that FM can be replaced by 40% of SBM without causing reduction in growth and protein utilization. In contrast, another study evaluating the effects of SBM replacing FM at different levels (0%, 5%, 10%, 20% and 30%) in diets for cobia, reported that the fish fed diets replacing FM by SBM by less than 10% had no significant reduction in growth and feed utilization (Wang, Wu, Xie, & Yu, 2005).

It has been demonstrated that in order to increase replacing level of FM by plant-protein based ingredients, the use of exogenous nutrients can help to compensate de lack of certain nutrients absent in plant sources. The biggest challenges of using soybean in diets of marine / carnivorous fish, is palatability / acceptability of feeds. Designing diets for carnivorous fish with high contents of plant meals, always requires additional supplementation of amino acids.

In one study conducted by Bor-Shing *et al.* (2007), graded levels (20%, 60%, 80% and 100%) of soy protein in cobia diets were supplemented (as feeding stimulants) with L-methionine, L-proline and betain hydrochloride. In this study, authors concluded that using amino acids as feeding stimulants added to SBM (supplemented at 20%) based diet improve feed intake, survival, weight gain and FCR. Although, the use of additionally supplemented amino acids (in diets for cobia formulated with high levels of soy-protein products), has demonstrated significant benefits, it is important to consider the combined use of other additives. Limitations in the use of soy-protein in diets for carnivorous species are well known. These include anti-nutritional factors, low levels of methionine and adverse effects in intestinal integrity (Gatlin *et al.* 2007). Since Mannan oligosaccharide (MOS) has been reported to promote gut health and integrity, supplementation of this additive has been used in order to ease high levels of FM replacement by SBM. MOS was supplemented in diets formulated with 50%, 75% and 100% of soy-protein replacing FM in cobia diets (Salze, McLean, Battle, Schwarz, & Craig, 2010). Authors observed that when replacing at 100% FM by soy protein concentrate in diets supplemented with a mixture of MOS, nucleotide rich extract and marine worm meal, experimental cobia exhibited one of the best weight gains and feed efficiencies compared to those shown in fish fed 50% and 75% FM replacement by soy protein concentrate diets (without supplementation of MOS, marine worm meal and nucleotide rich extract).

Another important factor affecting results of supplementation levels of soy products in diets, is pre-treatment of soy-protein before supplementation in diet. Effects of partial substitution of fish meal with four soybean products (solvent extracted soybean meal, fermented soybean meal – with *Bacillus subtilis* –, de-antinutrient soybean meal and soy concentrate) in cobia diets, was studied by Hsu & Chen (2005). Results of feeding trial showed that growth, feed conversion ratio, and protein efficiency ratio of the fish fed diets formulated with 40% de-antinutrient soybean meal, were significantly worse than other experimental groups supplemented with solvent extracted, fermented and soy concentrate meals. In contrast, growth and condition factor of the fish fed diets formulated with solvent extracted and fermented soybean meal (when replacement level ranked from 20 to 40%) were

comparatively better. Another study compared (in separated digestibility and growth trials) that a novel soybean cultivar (Navita™ non genetically modified and selectively bred soy) presents higher apparent digestibility coefficients, compared to those of regular commodity soybean meal (de-hulled, defatted, roasted and solvent extracted). Results of this study suggest that Nativia™, can be incorporated at very high levels in the diet of marine carnivorous fish such as cobia with no detriment to performance (feed conversion ratio, protein efficiency ratio, feed efficiency, mean daily intake, gross protein intake, gross energy intake, visceral somatic index, muscle ratio and hepatosomatic index), making it a prime candidate for FM replacement in aquafeeds (Suárez, Tudela, Davis, Daugherty, Taynor, Glass, Hoening, Buentello, & Benetti, 2013). Zhou, Mai, Tan, & Liu (2005) replaced FM by defatted soybean meal at 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% and 60%. Authors observed that weight gain decreased significantly when replacement level of FM protein was increased from 40% to 50%. This result indicated that up to 40% of FM can be replaced by defatted soybean meal without causing a significant reduction in growth. In another study, conducted by Watson, Buentello, & Place (2014), Navita premium feed ingredients (3010 solvent extracted soybean meal and 3032 cold-pressed soybean cake meal) were utilized to replace 50%, 60% or 70% and 40%, 50% or 60% of FM protein, respectively and were compared to a FM based reference formulation. None of the experimental diets performed significantly different from the reference diet in terms of weight gain or specific growth rate. However, the 3010 50% diet performed significantly better than the 3032 50% and 60% diets in regard to weight gain, specific growth rate and protein efficiency. Results of this study suggested that these two soybean protein sources appear to be a valuable FM replacement options for juvenile cobia.

4.2 Rapeseed meal (RM)

Rapeseed meal (RM), is called canola in North America, Australia and some other countries. It is the by-product of the extraction of oil from rapeseed (*Brassica napus* L., *Brassica rapa* L., and *Brassica juncea* L., and their crosses). It is widely used to feed all classes of livestock (terrestrial and aquatic). Worldwide production of rapeseed meal is second after soybean meal (USDA, 2016). Due to their high nutritional value rapeseed protein have great potential

Rodríguez-Estrada, U., Alvarez-González, C.A., Peña-Marín, E., Camarillo-Coop, S., Martínez-García, R. 2019. Worldwide Research Advances in Alternate Protein-Based Feedstuffs for Cobia (*Rachycentron canadum*) Diets. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 38-71.

as an alternative protein source for fish nutrition. They have relatively high protein content, which is distinguished by a well-balanced amino-acid composition and a high biological value. Rapeseed is one of the world's leading edible oil crops. In recent years rapeseed production has achieved an annual average growth rate of seven percent. The protein rich rapeseed meal is widely available and less expensive. Rapeseed meal contains certain ANF's such as: glucosinolates, phenolic compounds (tannins and phenolic acid), phytic acid, and indigestible carbohydrates. Rapeseed cake as protein source in diets of different fish species (e.g. common carp – *Cyprinus carpio* –, Rainbow trout – *Oncorhynchus mykiss* –, turbot – *Psetta maxima* –, tilapia – *Oreochromis niloticus* –), has been investigated by several authors (Adem, Tressel, Pudel, Slawski, & Schu, 2014).

Few have been the studies reporting the use of rapeseed as a protein source to replace of fish meal in cobia diets. Huang and Liao (2005) used 5%, 10% and 15% of RM in order to decrease 62%, 59% and 56% of fish meal. After a 6-week experimental period, authors observed that 10% was the optimal replacement without compromising performance of cobia. In other study conducted by Luo, Ai, Mai, Zhang, Xu, & Zhang (2012), effects of dietary RM level were investigated in feed intake, growth, survival, digestibility and protein metabolism in relation to gene expression of juvenile cobia. In this experiment practical diets were formulated by replacing 0%, 12.5%, 37.5% and 100% fish meal protein with RM protein. Replacement levels of FM by RM did not affect survival of cobia. However, with increasing RM levels, feed intake, specific growth rate and feed efficiency decreased. Authors also observed that apparent digestibility coefficients of dry mater, crude protein and energy significantly decreased with increasing dietary RM levels. While plasma ammonia, urea, cholesterol and amino acids were not affected by experimental diets. In the same experiment, fish fed the diet supplemented with 50% protein from RM showed lower aspartate amino transferase activity in liver and hepatic inulin-like growth factor I gene expression level was significantly increased in fish fed diet with 50% of dietary RM. Based in these results, authors concluded that protein from RM could substitute 12.5% of fish meal protein without influencing growth, feed utilization and protein metabolism in cobia.

4.3 Corn gluten meal (CGM)

Corn gluten meal (CGM) is a by-product of maize starch manufacture (and sometimes ethanol) by the wet-milling process. CGM is a protein-rich feed, containing about 65% crude protein (dry matter), used as a source of protein, energy and pigments for livestock species including fish (Rosentrater and Verbeek, 2017). It is also valued in pet food for its high protein digestibility. In the USA and Canada, corn gluten meal is also used as a fertilizer and pre-emergent weed killer. Corn gluten meal is obtained wherever maize is used for starch extraction. It is distributed worldwide. Its production has become relatively constant since ethanol is now mainly produced by dry-milling, which yields corn distillers rather than corn gluten meal and corn gluten feed (RFA, 2008). In aquaculture, CGM has demonstrated a significant potential as protein source, since it has several traits: high protein content, low anti-nutritional factors contents, and favorable essential amino acids (except for lysine and arginine). CGM can be a potential protein source alternative to FM protein for diets of rainbow trout, turbot, Japanese flounder, red sea bream, gilthead sea bream, Atlantic salmon, and Atlantic cod (Luo, Ai, Mai, Zhang, Xu, Zhang, & Liufu, 2013).

There are few investigations reporting replacement of FM with CGM in cobia diets. Zhou, Chen, & Lin, (2012), studied the replacement of FM by CGM (10%) compared with defatted soybean meal (10% and 20%) and beer yeast meal (10%). Survival was not affected by experimental diets. Authors concluded that studied alternate ingredients can replace FM up until 10% without affecting fish performance. Luo, Ai, Mai, Zhang, Xu, Zhang, & Liufu (2013), investigated the effects of dietary CGM levels (0%, 17.5%, 35%, 52.5%, and 70.0%) on fish growth, whole body composition and protein metabolism in relation to specific gene expression. Authors observed a significant decrease of feed intake, specific growth rate, feed efficiency, protein productive value, whole-body crude protein and lipids, plasma total protein, cholesterol contents, and hepatic inulin-like growth factor I (IGF-I), when cobia was fed diet with 70.0% of CGM. This study indicated that 52.5% of FM protein could be replaced by CGM in the diets without significantly influencing growth, feed utilization and protein metabolism of juvenile cobia. Other investigation conducted by Zhou, Tan, Mai, & Liu (2004), compared apparent digestibility coefficients of dry matter, crude protein, crude

lipid, gross energy, phosphorous, and amino acids of Peruvian FM and several other ingredients (defatted SBM/roasted and solvent extract, defatted SBM/solvent extracted, PBM, MBM, peanut meal, RM) including CGM, for juvenile cobia. Authors observed that apparent digestibility coefficients of dry matter, crude protein, crude lipid and gross energy were the highest for Peruvian FM and CGM. Results indicated that CGM and animal products (Peruvian FM, PBM, MBM), presents similar apparent dry matter digestibility (60.42% – 87.56%) coefficients in juvenile cobia. While apparent dry matter digestibility for plant products (SBM's, peanut meal, RM) was 58.52% – 70.51%. Phosphorous digestibility of CGM was comparable with that shown in Peruvian FM. CGM showed similar apparent energy digestibility compared to that shown in MBM, PBM, defatted SBM and Peruvian FM. According to these results, authors concluded that CGM, represents a low-cost FM replacement for cobia diets.

5. Animal protein-based feedstuffs

Animal protein-based feedstuffs such as shrimp hydrolysates (SPH), shrimp waste meal (SWM), fish silage (FS), crab silage (CS), blood meal (BM), feather meal (FthM), meat and bone meal (MBM), and poultry byproducts meal (PBM), has been studied. They present a favorable cost-per-unit protein compared to many other protein sources in fish feeds. Animal protein-based feedstuffs are produced using a variety of raw materials and cooking and drying conditions. They are a directly comparable substitute for FM because of their amino acid composition, compared to those shown in most plant products. Additionally, animal protein-based feedstuffs contain different levels of essential minerals, phospholipids, and cholesterol, depending on the product. However, they are highly variable in terms of nutritional content (Foster 2006). Table 2, shows a summary of animal protein-based feedstuffs replacing FM in cobia diets.

Table 2. Summary of studies related to the use of animal protein-based feedstuffs replacing FM in cobia diets.

Feedstuff	Pre-treatment / form	Additional ingredients	Replacement levels used	Parameters studied	Optimum replacement level suggested	References
SM	Hydrolysate	-----	0%, 12%, 24%, 36%	Survival, growth, feed efficiency,	12%	Costa-Bomfim <i>et al.</i> , 2016
	Waste	-----	0%, 10%, 20%, and 25%	Growth, feed efficiency, hepatosomatic index, muscle lipid content, Chitinase activity (pyloric caeca and foregut, challenge test with <i>Photobacterium damasela</i>)	10%	Lu and Ku, 2012
FS & CS	Raw fish, raw crab / Silage fish, silage crab	-----	60%	growth, nutrient utilization	60% (raw fish / raw crab)	Mach <i>et al.</i> , 2010
PBM	Untreated	-----	20%, 40%, 60%, 80%, 100%	growth, nutrient utilization, hepatosomatic index	60%	Saadiah <i>et al.</i> , 2011
	Untreated	Lysine / Methionine	15%, 30%, 45%, 60%	Nutrient utilization, feed efficiency, hepatosomatic index, immunity, hematology	30.75%	Zhou <i>et al.</i> , 2011
Other animal protein-based sources: BM, MBM, FthM	Untreated	-----	70% (reference diet) + 30% of CGM	Apparent digestibility coefficients	Not determined. However, Acceptable apparent digestibility coefficients of tested feedstuffs when supplemented at 30%	Chi <i>et al.</i> , 2016

SM = Shrimp meal
 FS = Fish silage
 CS = Crab silage
 PBM = Poultry by-product meal
 BM = Blood meal
 MBM = Meat & bone meal
 FthM = Feather meal

5.1 Shrimp hydrolysates (SPH), Shrimp waste meal (SWM) and fish (FS) & crab silage (CS)

Crustacean processing industry has seen significant expansion in the past decades and each year production rates are several thousand tons. This industry generates a significant amount of bio-waste. Valuable compounds such as chitin, proteins and carotenoids are present in these kind of by-products (Peng, Hou, Li, & Mu, 2019). Shrimp and crab processing products (hydrolysates and silage) are an alternative protein source for aquaculture diets. Hydrolysates are a widespread by product used as replacer of FM (Refstie, Olli, & Standal, 2004). They

Rodríguez-Estrada, U., Alvarez-González, C.A., Peña-Marín, E., Camarillo-Coop, S., Martínez-García, R. 2019. Worldwide Research Advances in Alternate Protein-Based Feedstuffs for Cobia (*Rachycentron canadum*) Diets. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 38-71.

contain soluble, low molecular weight peptides and free amino acids. The inclusion of hydrolysates in fish diets generally increases growth and feed utilization and promotes non-specific immunity by enhancing fish macrophage activity (Costa-Bomfim, Silva, Bezerra, Druzian, & Cavalli, 2016). SWM is a by-product of marine food processing. In Asia, farmers replace some feed with shrimp waste to save on production costs and have found that shrimp waste is good for cobia. SW has been previously tested in seabream, Japanese eel and Yellowtail. It may also be used as a source of chitin, which has been studied as a prospective immunostimulant for fish (Lu and Ku, 2012). On the other hand, silage-processed products are important sources of proteins. Silage might be made by adding organic or inorganic acid or a mix of both, using a substrate (e.g. fish or crustaceans). This is called acid silage. Fermented silage is usually mixed with molasses or lactic acid bacteria. Silage has been tested as feed ingredient in aquaculture species such as Atlantic salmon, rainbow trout, tilapia, and abalone (Mach, Nguyen, & Nortvedt, 2010).

Shrimp protein hydrolysate (SPH) as a replacer of FM in cobia diets was studied by Costa-Bomfim *et al.* (2016). Authors used a SPH containing 89.42% of crude protein and 5.43% of total lipids as FM replacer in juvenile cobia diets. SPH was supplemented at 0%, 12%, 24% or 36% of dietary crude protein derived from SPH. Experimental diets did not affect fish survival. Fish fed control and diet containing 12% of SPH had higher weight gain, specific growth rate, and feed conversion ratio. While Nitrogen retention efficiency was significantly higher for fish fed diets 0% and 12%. Authors concluded that up to 12% of SPH in cobia diets can be used with no significant effects on feed utilization and fish performance. Shrimp waste meal (SWM), as an alternate protein source of FM in cobia diets, was reported by Lu and Ku (2012). In this study FM was substituted by SWM at fractions of 0%, 10%, 20%, and 25% of the diet. Weight gain and feed conversion rate increased as SWM increased from 0% to 25%. In addition, hepatosomatic index increased significantly when SWM was 20 and 25%. Muscle lipid content was low when fish fed in diets with high SWM level. Chitinase activity was extremely high in the pyloric caeca tissue of cobia, and increased specific activities of chitinase were only found in the foregut of cobia fed diets 10% SWM. Challenge test showed that SWM could not enhance cobia resistance to *Photobacterium damsela* spp.

Piscicida infection. Results suggest that 10% of SWM diet could potentially reduce the use of FM in the diet of cobia. Mach *et al.* (2010), evaluated the potential use of lizard fish (*Saurida undosquamis*) or blue crab (*Portunus pelagicus*) acid silage protein for juvenile cobia (23-25 g). Authors used moist diets using either raw fish diet, fish silage diet, raw crab diet, crab silage diet, mixed raw fish / raw crab diet or mixed fish / crab silage diet. Weight gain and specific growth rate were significantly higher in cobia fed raw based diets and fish silage diet than in fish fed crab silage and mixed fish / crab silage diets. Feed conversion ratios were significantly higher in the groups fed crab silage diet and mixed fish /crab silage diet, than in the groups fed the other diets resulting in significantly lower protein productive values in the groups fed crab silage diet and mixed fish / crab silage diet than in the other groups. Authors concluded that raw-based diets were better utilized by juvenile cobia than silage-based diets, particularly the diet made from crab silage.

5.2 Poultry by-product meal (PBM)

PBM is a high protein commodity used as major component in animal husbandry formulations. It is made by combining the by-products coming from poultry slaughterhouses or poultry processing plants. It is defined as ground, rendered, clean parts of the carcass of slaughtered poultry such as necks, heads, feet, undeveloped eggs, gizzards and intestines (without contents), exclusive of feathers (except in such amounts as might occur unavoidably in good processing practices). Whole poultry carcass meal can also be obtained from culled laying hens (spent hen meal), notably in areas where there is no market for culled hens (Hertrampf, & Piedad-Pascual, 2000). PBM is a good alternative protein source to replace fishmeal. It contains high protein levels (60-80%), is highly digestible and is commercially available in the market in high volumes and controlled quality. PBM as a fishmeal replacement has been reported in various aquaculture species such as Nile tilapia, grouper, rainbow trout, and gilthead seabream and with many other species with varying inclusion levels in the diets (Saadiah, Abol-Munafi, & Utama, 2011).

An 8-week feeding trial was conducted by Saadiah *et al.* (2011), evaluating the use of PBM in replacement of imported FM in the diets of cobia. In this experiment FM was replaced by PBM at 20%, 40%, 60%, 80%, and 100% dietary protein. Specific growth rate, weight gain

and protein efficiency ratio was not compromised by supplementation of PBM in diets. Additionally, it was observed that PBM did not affect hepatosomatic index of experimental fish. Results from this study suggested that PBM could replace 100% dietary fishmeal without adversely affecting the growth performance of cobia, but an optimal replacement at approximately 60% was recommended for better growth and efficient feed utilization. In another study, conducted by Zhou, Zhao, Li, Wang, Wang (2011), partial replacement of FM protein by PBM was studied. Diets were formulated to contain graded levels of PBM (15%, 30%, 45%, and 60%) without lysine and methionine supplementation. Results showed that growth performance and survival for fish fed experimental diets supplemented with PMB, were not affected. However, protein efficiency ratio and feed efficiency ratio were significantly affected by the replacement level of fish meal protein with PBM. Fish fed with 30% and 45% PBM supplementation levels had higher hepatosomatic index than fish fed other diets. Graded levels did not affect immune status and hematology of fish. Results of this study indicated that good quality terrestrial PBM can successfully replace fish meal in the commercial diets for cobia, and the optimal level for fish meal replacement with PBM was determined by quadratic regression analysis to be 30.75% on the basis of maximum protein efficiency ratio.

5.3 Other animal protein-based sources

Other animal protein-based feedstuffs that have attracted the attention in cobia nutrition are: blood meal (BM), meat & bone meal (MBM), and feather meal (FthM).

Blood can be collected during the slaughter of various livestock species (cattle, pigs, chickens, etc.) under a wide range of conditions. It is usually dried and made into blood meal so that it can be handled and incorporated into rations more easily. BM contains mostly protein and is used to supplement diets based on cereal grains, plant by-products and forages. It has been shown to be a satisfactory replacement for other protein sources in various animal production diets for dairy cattle, beef cattle, sheep, pigs, poultry, various fish species and silkworms. However, BM is not very palatable and its amino acid content is imbalanced

(King'ori, Tuitoek, & Muiruri, 1998). BM has been incorporated in practical diets for different species such as catfish, tilapia and trout among others (Njieassam, 2016).

MBM is typically about 48-52% protein, 33-35% ash, 8-12% fat, and 4-7% water. It is primarily used in the formulation of animal feeds to improve amino acid profile of diet formulation. MBM is considered as a good source of vitamin and minerals (Adedokun and Adeola, 2005). For a long time, MBM has been used mainly as a source of high quality protein, an essential raw material to elaborate diets for animals in need of protein with high biological value. Besides, it also contains phosphorus, an important mineral in animal metabolism. The increase in soybean meal utilization resulted in a decrease in the use of MBM as the main protein source. Thus, it became the first choice as a phosphorus source, due to the high cost of the inorganic sources for that mineral (Sartorelli, Bertechini, Fassani, Kato, & Fialho, 2003). In aquaculture diets, MBM has been widely used in several species, such as tilapia, shrimp and trout diets (Yu, 2004).

FthM is a byproduct of processing poultry. It is made from poultry feathers through a process called rendering. Steam pressure cookers with temperatures over 140 °C are used to "cook" and sterilize the feathers. This partially hydrolyzes the proteins, which denatures them. It is then dried, cooled and ground into a powder for use as a nitrogen source for animal feed or as an organic soil amendment (Latshaw, Musharaf, & Retrum, 1994). In aquaculture, FthM has been widely used in salmonid feeds. In North and South America, feather meal has been used for many years now and at increasing levels in recent years. The hesitance to use feather meal is due to the believe that feather meal is poorly digestible and its smell could influence the feed intake when administered at high levels. However, the interest is growing to start using it, as many studies show that feather meal gives significant opportunities to improve the cost-effectiveness of fish feeds without losing fish performance. At the same time, clear improvements have been made to reduce the variability in the quality and nutritive value of this product (Coolsaet 2015).

Worldwide, there are available and relatively inexpensive feedstuffs such as MBM, FthM and BM. Knowledge about nutritional values and digestibility coefficients of these feedstuffs

is fundamental to determine its potentiality as fish meal replacers not only to improve formulation of diets that maximize fish growth by providing appropriate amounts of available nutrients but also to limit the amount of waste produced by fish. Chi, Wang, Tan, Dong, Yang, Liu, & Zhang (2016), determined apparent digestibility coefficients of crude protein, lipid, phosphorous and amino acids as well as energy of 13 feedstuffs (including five types of fishmeal, three types of MBM, two types of FthM, one type of shrimp meal and two types of BM) for cobia. Apparent digestibility coefficients of crude protein, lipid, energy, phosphorous and amino acids of the test ingredients ranged from 68.97% to 92.5%, 69.3% to 95.7, 77.5% to 98.3%, 58.2% to 80.1% and 72.5% to 97.0%, respectively. Apparent digestibility coefficients of crude protein of BM, MBM, were significantly higher than those of FthM (fermented and hydrolyzed). The apparent digestibility coefficients of lipid of BM and FthM were significantly lower than those of other feedstuffs. Apparent digestibility coefficient of energy of FthM was significantly lower than those of other feedstuffs. Coefficients of phosphorous of BM, MBM and FthM were significantly lower compared to those presented in regular FM.

6. Single-cell protein meal (SCPM)

Single-cell protein meal (SCPM) are dried cells of microorganism, which are used as protein supplement in human foods or animal feeds. Microorganisms like algae, fungi, yeast and bacteria, utilize inexpensive feedstock and wastes as sources of carbon and energy for growth to produce biomass, protein concentrate or amino acids. Since protein accounts for the quantitatively important part of the microbial cells, these microorganisms, also called single cell protein as natural protein concentrate. Although single cell protein has high nutritive value due to higher protein, vitamin, essential amino acids and lipid content, there is a doubt to be replaced to the conventional protein sources due to their high nucleic acid content and slower in digestibility (Nasseri, Rasoul-Amini, Hossein-Morowvat, & Younes, 2011). Table 3, presents a summary of studies related to the use of single-cell protein-based feedstuffs replacing fishmeal in cobia diets.

Table 3. Summary of studies related to the use of single-cell protein-based feedstuffs replacing FM in cobia diets.

Feedstuff	Pre-treatment / form	Additional ingredients	Replacement levels used	Parameters studied	Optimum replacement level suggested	References
SCPM	Organically certified protein	-----	25%, 50%, 75%, 100%	Growth, feed efficiency, hepatosomatic & visceral somatic indexes, muscle ratio	25%	Lunger <i>et al.</i> , 2016
	Organically certified yeast	-----	25%, 40%	Growth, nutrient utilization, fillet quality	40%	Lunger <i>et al.</i> , 2017a
	Organically certified protein	Methionine, tryptophan, taurine	50%, 75%, 100%	Growth, muscle ratio, visceral & hepatosomatic indexes	100%	Lunger <i>et al.</i> , 2017b

SCPM = Single-Cell Protein Meal

he biomass or protein extract from pure or mixed cultures of algae, yeasts, fungi or bacteria may be used as an ingredient or a substitute for protein-rich foods, and is suitable for human consumption or as animal feeds (Fatemeh, Reihani, & Khosravi-Darani (2019). SCPM is commonly grown on agricultural waste products, and as such inherits the ecological footprint. SCPM may also be produced entirely independent of agricultural waste products through autotrophic growth. Thanks to the high diversity of microbial metabolism, autotrophic SCPM provides several different modes of growth, versatile options of nutrients recycling, and a substantially increased efficiency compared to crops (Khoshnevisan, Tsapekos, Zhang, Valverde-Pérez, & Angelidaki, 2019). SCPM has become a very interesting alternative protein source for inclusion in fish feed (Overland, Karlsson, Torunn-Mydland, Helge-Romarheim, & Skrede, 2013). The nutritional value or its constituents, such as proteins, B-vitamins, pigments and β -glucans, has been suggested to be sufficiently high to make it a good replacement for fish protein. In order to make suitable microorganisms for SCPM production, they should be: non-pathogenic to plants, humans and animals, useable as food and feed, have good nutritional values, do not contain toxic compounds, have low production costs (Anupama & Ravindra, 2000).

Some studies have been conducted with the use of SCPM as FM replacer in cobia diets, obtaining substantial results. Lunger, Craig, & McLean (2006), conducted the first attempt to utilize an organically certified protein source as a replacement for FM in diets for juvenile cobia. In this study, yeast-based protein source replaced Special Select® menhaden FM at 25%, 50%, 75% and 100% of dietary protein. Weight gain and feed conversion ratio were affected by inclusion of yeast-based protein source, with decreasing values as inclusion levels

of the yeast-based protein source rose above 25% of dietary protein. Cobia fed the diet containing 25% of dietary protein from the yeast-based protein source had equal weight gain and feed conversion ratio values as fish fed the control diet composed by 100% FM. Biological indices including hepatosomatic index, visceral somatic index and muscle ratio were all similarly affected by inclusion of the yeast-based protein source, with significant impacts when inclusion levels rose above 25% of dietary protein. Although levels of inclusion of the yeast-based protein source above 50% of dietary protein resulted in detrimental effects on production characteristics, the data clearly suggest that, at a minimum, 25% of dietary protein can be provided by this protein source for cobia diets. In a later study, Lunger, McLean, & Craig (2007a), assess the effects in growth, nutrient utilization and fillet quality of 25% and 40% inclusion of NuPro® (an organically certified yeast-derived protein source) and 40% inclusion of organically certified soybean meal, soybean isolate, or hemp seed meal. Results indicate that up to 40% fish meal protein can be replaced by organically certifiable alternate proteins used in this study without detrimental impacts on weight gain, feed efficiency, biological indices, or fillet composition in juvenile cobia.

Higher dietary inclusion rates of organically certified yeast-based protein might be problematic due to amino acid imbalances (Craig, & McLean, 2006). Methionine, tryptophan and taurine presents significant deficiencies in many plant proteins and SCPM. Methionine and tryptophan are essential amino acid required by fish for normal growth and metabolic functions (NRC 2011). This amino acid deficiency condition, limits SCPM inclusion in large amounts in diets. Deficiencies of methionine and tryptophan result in reduced growth rates, feed efficiency and survival (Goff & Gatlin, 2004). Therefore, in order to avoid these problems, exogenous amino acids must be supplemented in diets, so that growth is not compromised (Takagi, Shimeno, Hosokawa, & Ukawa, 2001). Although taurine is not considered an essential amino acid because it can be synthesized by fish, its supplementation in diets with high inclusion levels of alternative protein meals, improve weight gain and feed efficiency as shown in marine fish such as olive flounder (Kim, Takeuchi, Akimoto, Furuita, Yamamoto, Yokohama, & Murata, 2005). Lunger, McLean, Gaylord, & Kuhn, & Craig (2007b) conducted one study intended to examine whether higher levels of FM could be

replaced in cobia diets utilizing yeast-based proteins and specific amino acid supplementation including methionine, tryptophan and taurine. This study was divided in two trials. In the first, diets were formulated to contain 41% crude protein and 13% lipid, and a yeast-based protein replaced FM at 50% and 75% with and without supplemental taurine at 0.5g / 100 g dry diet. Control diet contain 100% herring FM. Methionine and tryptophan were added to all diets except the control to resemble the amino acid profile of FM. Results from this study indicated that fish fed diets supplemented with taurine exhibited significantly higher weight gain and better feed efficiencies than all other fish. Experimental diet significantly impacted biological indices such as muscle ratio, visceral somatic index, and hepatosomatic index. The 75% yeast-based protein diet without taurine returned the lowest muscle ratio values and the highest visceral somatic index and hepatosomatic index values. In the second trial, diets were formulated to contain 43% crude protein and 11% lipid, with the control diet containing 100% herring FM and the same yeast-based protein replacing FM at 50, 75, and 100% of dietary protein. All diets except the control were supplemented with taurine at 0.5 g/100 g dry diet. Results from this study indicated that increasing amount of yeast-based protein led to decreased weight gains and feed efficiencies regardless of taurine supplementation. It is obvious from the results from both studies that taurine supplementation does have a significant impact on growth and feed efficiency of juvenile cobia when they are fed diets containing high levels of plant-based proteins as replacements for FM. In this study, authors concluded that alternate proteins, especially those of plant and yeast-based origin can be incorporated at very high levels in diets for cobia with proper amino acid supplementation.

7. Future prospects

Cobia is a marine carnivorous fish that requires large quantities of FM as protein source. This condition, significantly increases the demand of FM by industry supplying feeds for this species. One of the biggest constraint of cobia diets, is the limited knowledge related to the use of alternate feedstuffs replacing FM. Recent studies have been targeted in finding alternate protein sources in cobia diets. Available literature is focused in several key aspects such as: plant protein-based meals, terrestrial animal proteins, crustacean meals and single-cell feedstuffs. Although research into the use of alternate feedstuffs in cobia diets is still

limited, it appears to have a solid foundation with a range of products evaluated and some promising results. There are some research priorities visualized, based on the information reviewed in this manuscript.

As analyzed in present manuscript, there is a significant importance to study alternate ingredient digestibility. Research in this area should be considered a priority in order to identify digestibility of further economically and environmentally friendly ingredients in cobia fish at different life stages. This knowledge will be useful to assess efficiency of each alternate ingredient which allows to properly design formulated diets for cobia. Palatability is another fundamental issue to consider when cobia diets are formulated with protein sources different to FM. This is of significant importance in terms of alternate protein supplementation because the unsustainable natural difference from FM.

Another scientific priority, is the search of new and novel protein sources as alternate protein-based ingredients for cobia diets. In recent years, insects have begun to play a fundamental role in aquatic animal diets. Insects represent the most biodiverse group of animals on earth. They are important part of natural diet of carnivorous and omnivorous fish (Henry, Gasco, Piccolo, & Fountoulaki, 2015). During larval and fingerling stages, different insect species play a fundamental role of fish diets. Insects can be found in most aquatic environments even in open sea (Voshel, 2009). They are valuable protein sources in aquaculture nutrition because of their protein contents which can range between 9.3% and 76% (Payne, Scarborough, Rayner, & Nonaka, 2015). Carnivorous fish like cobia requires more protein levels in its diets than those required by herbivorous and detritivorous species. Previous studies have been conducted in replacing FM by insect meal in carnivorous fish diets obtaining substantial results indicating the sustainability of this kind of protein source (Belhit, Liland, Gjesdal, Biancarosa, Menchetti, Li, Waabo, Krogdahl, & Lock, 2019; Stengerg, Holen, Piemontese, Liland, Lock, Espe, & Belghit, 2019) supplemented in aquaculture diets. Results of these investigations suggest that insect-protein based meals can replace FM in a carnivorous fish diets like cobia.

Future animal feeds, not only for cobia but also for any kind of aquaculture organism, should be based on sustainable feed sources that do not compete directly with human food. The key is to develop sustainable feed ingredients from natural bio-resources that are not suitable for direct human consumption. These new food products can be developed from forestry and marine sources. Such is the case of biotechnological transformation of non-food (non-edible) biomasses and agri-food rest raw materials into novel high-quality feed ingredients. Where woody / algal biomasses through an enzymatic hydrolysis (Lytic Polysaccharide Monooxygenases) and yeast fermentation are converted to a yeast broth and then dried yeast biomass (50-60% if crude protein and 6-10% nucleic acids and 2-10% lipids) that is used as FM replacer in fish diets (Mydland, 2015).

8. References

- Adedokun S.A., and Adeola O. (2005) Metabolizable energy value of meat and bone meal for pigs. *Journal of Animal Science* **83**(11), 2519-2526. <https://doi.org/10.2527/2005.83112519x>
- Adem H.N., Tressel R.P., Pudiel F., Slawski H., and Schu C. (2014) Rapeseed – Tremendous potential for added value generation. *OCL Oil Seeds and Fat Crops & Lipids* **21**(1), D105. <https://doi.org/10.1051/ocl/2013041>
- Aliabadi M.A.S., Gilkolaei S.R., Savari A., Zolgharnein H., and Nabavi S.M.B. (2008) Microsatellite polymorphism in Iranian populations of cobia (*Rachycentron canadum* G.). *Biotechnology* **7**(4), 775-780. <https://doi.org/10.3923/biotech.2008.775.780>
- Anupama and Ravindra P. (2000) Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology advances* **18**(6), 459-479. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00045-8](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00045-8)
- Arendt M.D., Olney J.E., and Lucy J.A. (2001) Stomach content analysis of cobia, *Rachycentron canadum*, from lower Chesapeake Bay. *Fisheries bulletin* **99**(4), 665-670. <http://fishbull.noaa.gov/994/are2.pdf>
- Arnold C.R., Kaiser J.B., and Holt G.J. (2002). Spawning of Cobia *Rachycentron canadum* in captivity. *Journal of the world aquaculture society* **33**(2), 205-208. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2002.tb00496.x>
- Atwood H.L., Young S.P., Tomasso J.R., and Smith T.I.J. (2004) Resistance of cobia, *Rachycentron canadum*, juveniles to low salinity, low temperature, and high environmental nitrite concentrations. *Journal of applied aquaculture* **15**(3-4), 191-195. http://dx.doi.org/10.1300/J028v15n03_16
- Belhit I., Liland N.S., Gjesdal P., Biancarosa I., Menchetti E., Li Y., Waabo R., Krogdahl A., and Lock E-J. (2019) Black soldier fly larvae meal can replace fish meal in diets of sea-water phase Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **503**, 609-619. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.032>
- Benetti D.D., O'Hanlon B., Rivera J.A., Welch A.W., Maxey C., and Orhun M.R. (2010) Growth rates of cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in open ocean submerged cages in the Caribbean. *Aquaculture* **302**(3-4), 95-201. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.021>
- Bor-Shing L., and Chen T.I. (2004) Feeding stimulatory effect of nucleotides and related compounds on juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Taiwan Fisheries Research*, **12**(2), 49-55. <http://www.tfrin.gov.tw/ct.asp?xItem=251618&ctNode=835&mp=3>
- Bor-Shing L., and Chen T.I. (2007) Effects of amino acids added and soy protein replacement on the growth of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Taiwan Fisheries Research* **15**(1), 55-61.
- Bullard S.A., and Overstreet R.M. (2006) *Psettarium anthicum* sp. n. (Digenea: Sanguinicolidae) from the hearth of cobia *Rachycentron canadum* (Rachycentridae) in the northern Gulf of Mexico. *Folia Parasitológica* **53**, 117-124. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16898125>
- Cavalheiro-Araújo B., Masaaki-Honji R., Nishioka-Rombenso A., Brambila-de Souza G., Henrique-de Mello P., Silva-Hilsdorf A., and Guimaraes-Moreira R. (2019) Influences of different arachidonic acid levels and temperature on the growth performance, fatty acid profile, liver morphology and expression of

- lipid genes in cobia (*Rachycentron canadum*) juveniles. *Aquaculture* **511**, 73425. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734245>
- Cavalli R.O., and Hamilton S. (2009) Piscicultura marinha no Brasil com ênfase na produção do beijupirá. *Revista Brasileira de reprodução animal Belo Horizonte* **6**, 64-69. <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/p64-69.pdf>
- Chang C.F., Yang J.H., Chou R.L., Her B.Y., Chang S.L., Hsu C.H., and Chen T.I. (2008) Effects of dietary β -1,3_1,6-glucan on non-specific immune response of cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Taiwan Fisheries Research* **16(1)**, 87-95.
- Chen H.Y. (2005) Nutritional problems of cobia fed with feeds rich in plant ingredients. *World Aquaculture Society (Presentation)*. <https://www.was.org/Documents/MeetingPresentations/WA2005/WA2005-657.pdf>
- Cheng-Ting H., Sha M., Fan-Hua N., and Shi-Mu, J. (2011) Study on regional production and economy of cobia *Rachycentron canadum* commercial cage culture. *Aquaculture International*, **19**, 649-664. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9391-y>
- Chi S., Tan B., Dong X., Yang Q., Liu H., Xu Y., and Huang H. (2011) Effects of supplementation microcapsule or crystalline methionine in diets on related enzyme activity of cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Fisheries Science China Zhongguo Shuichan Kexue* **18(1)**, 110-118. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1118.2011.00110>
- Chi, S., Tan B., Dong X., Yang Q., Liu H., Xu Y., and Huang H. (2011) Effect of supplementation microcapsule or crystalline methionine in diets on related enzyme activity of cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Fisheries Science China/Zhongguo Shuichan Kexue* **18(1)**, 110-118.
- Chi S., Wang W., Tan B., Dong X., Yang Q., Liu H., and Zhang S. (2016) The apparent digestibility coefficients of 13 selected animal feedstuff for cobia, *Rachycentron canadum*. *Journal of the World Aquaculture Society* **48(2)**, 280-289. <https://doi.org/10.1111/jwas.12347>
- Chou R-L., Su M-S., and Chen H-Y. (2001) Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* **193(1-2)**, 81-89. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00480-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00480-4)
- Chou R.L., Her B.Y., Wang G., Wu Y.H., and Chen H.Y. (2004) Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* **229(1-4)**, 325-333. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00395-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00395-8)
- Chow C.J., and Yang J.I. (2011) The effect of process variables for production of cobia (*Rachycentron canadum*) skin gelatin hydro lysates with anti-oxidant properties. *Journal of food biochemistry* **35(3)**, 715-734. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4514.2010.00412.x/abstract>
- Chu, Q., Ye F., Song B., Shi G., and Chen G. (2005) Feeding and growth of *Rachycentron canadum* during early development. *Journal of Zhanjiang Ocean University* **25(3)**, 8-12.

- Chuang J. L., Lin R.T., and Shiau C.Y. (2007) The relationship between chemical compositions and body weight of cultured cobia (*Rachycentron canadum*) of different growing stages. *Journal of Fisheries Society of Taiwan* **34(1)**, 21-30.
- Colburn H.R., Walker A.B., Berlinsky D.L., and Nardi G.C. (2008) Factors affecting survival of cobia, *Rachycentron canadum*, during simulated transport. *Journal of world aquaculture society*, **39(5)**, 678-683. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-7345.2008.00205.x/abstract>
- Coolsaet N. (2015) Feather meal: a useful addition to fish feed. *All About Feeds* **23 November 2015**. <https://www.allaboutfeed.net/Feed-Additives/Articles/2015/11/Feather-meal-A-useful-addition-to-fish-feed-2711133W/>
- Costa-Bomfim C.N., Pessoa W.V.N., Oliveira R.L.M., Farias J.L., Domingues E.C., Hamilton S., and Cavalli R.O. (2014) The effect of feeding frequency on growth performance of juvenile cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766). *Journal of Applied Ichthyology / Zeitschrift für angewandte Ichthyologie* **30(1)**, 135-139. <https://doi.org/10.1111/jai.12339>
- Costa-Bomfim C.N., Silva V.A., Bezerra R.S., Druzian J.I., and Cavalli R.O. (2016) Growth, feed efficiency and body composition of juvenile cobia (*Rachycentron canadum* Linnaeus 1766) fed increasing dietary levels of shrimp protein hydrolysate. *Aquaculture Research* **48(4)**, 1759-1766. <https://doi.org/10.1111/are.13013>
- Craig S.R., and McLean E. (2006) Nutrigenomics in aquaculture research: a key in the “Aquanomic” revolution. In: Jacques K., Lyons P. (Eds.), *Nutritional Biotechnology in the Food and and Feed Industry*. Nottingham University Press, UK.
- Darracott A. (1977) Availability, morphometrics, feeding and breeding activity in a multi-species, demersal fish stock of the western Indian Ocean. *Fisheries biology* **10(1)**, 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04036.x>
- Dias J. (1999) Lipid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): Nutritional regulation of Hepatic Lipogenesis. *PhD dissertation, University of Porto (Portugal) and University pf Bordeaux (France)*.
- Ding Z., Li W., Huang J., Yi B., and Xu Y. (2016) Dietary alanyl-glutamine and vitamin E supplements could considerably promote the expression of GPx and PPAR α genes, antioxidation, feed utilization, growth, and improve composition of juvenile cobia. *Aquaculture* **470**, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.015>
- Fatemeh S., Reihani S., and Khosravi-Darani K. (2019) Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology* **37**, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.11.005>
- Faulk C.K., Bennghoff A.D., and Holt G.J. (2007) Ontogeny of the gastrointestinal tract and selected digestive enzymes in cobia *Rachycentron canadum* (L.). *Journal of fish biology* **70**, 567-583. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01330.x>

- Faulk C.K., and Holt G.J. (2008) Biochemical composition and quality of captive-spawned cobia *Rachycentron canadum* eggs. *Aquaculture* **279**(1-4), 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.050>
- Foster I. (2006) Use of rendered terrestrial animal by-products in aquatic feeds. In: editors: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G.. Nieto López, David A. Villareal Cavazos, Ana C. Puello Cruz and Armando García Ortega. *Avances en Nutrición Acuicola VIII. Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.
- Fournier V., Huelvan C., Debruyeres E., 2004. Incorporation of a mixture of plant feedstuffs as a substitute for fish meal in diets of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* **236**, 451-465. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.035>
- Gatlin III D.M., Barrows F.T., Brown P., Dabrowsky K., Gaylord T.G., Hardy R.W., Herman E., Hu G., Krogdahl A., Nelson R., Overturf K., Rust M., Sealey W., Skonberg D., Souza E.J., Stone D., Wilson R., and Wertele E. (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research* **38**(6), 551-579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>
- Glencross B., Booth M., and Allan G.L. (2007) A feed is only as good as its ingredients – a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition* **13**(1), 17-34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00450.x>
- Goff J.B., and Gatlin D.M. (2004) Evaluation of different sulfur amino acid compounds in the diet of red drum, *Sciaenops ocellatus*, and sparing value of cysteine for methionine. *Aquaculture* **241**(1-4), 465-477. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.002>
- Gómez-Requeni P., Mingarro M., Calduch-Giner J.A., Médale F., Martin S.A.M., Houlihan D.F., Kaushik S., and Pérez-Sánchez J. (2004) Protein growth performance, amino acid utilization and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **232**(1-4), 493-510. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00532-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00532-5)
- Gopakumar G., Nazar A.K.A., Tamilmani G., Sakthivel M.K.C., Kalidas C., Ramamoorthy N., Palanichamy S., Maharshi V.A., Rao K.S., and Rao G.S. (2011) Broodstock development and controlled breeding of cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus 1766) from Indian seas. *Indian journal of fisheries* **58**(4), 27-32. http://eprints.cmfri.org.in/8816/1/G._Gopakumar.pdf
- Henry M, Gasco L, Piccolo G, and Fountoulaki E. (2015) Review on the use of insects in the diet of farmed fish: past and future. *Animal Feed Science and Technology* **203**, 1– 22. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.03.001>
- Hertrampf J.W. and Piedad-Pascual F. (2000) Handbook on ingredients for aquaculture feeds. Kluwer Academic Publishers, 624 pp. https://books.google.com.mx/books?id=o9P5F2mvii0C&redir_esc=y&hl=pt-BR

- Huang H.L., and Liao W.L. (2005) Effect of dietary supplemented of rapeseed as a replacement for fish meal on the growth of cobia, *Rachycentron canadum*. *Journal of Fisheries Society of Taiwan* **32(1)**, 113-114.
- Hsu G.P., and Chen H.Y. (2005) Substituting fish meal with soybean products in the diet of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of Fisheries Society of Taiwan* **32(1)**, 111.
- Huang C.T., Miao S., Nan F.H., and Jung S.M. (2011) Study on regional production and economy of cobia *Rachycentron canadum* commercial cage culture. *Aquaculture international* **19(4)**, 649-664. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10499-010-9391-y>
- Kaushik S.J., Covés D., Dutto G., and Blanc D. (2004) Almost total replacement of fish meal protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* **230(1-4)**, 391-404. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00422-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00422-8)
- Khoshnevisan B., Tsapekos P., Zhang Y., Valverde-Pérez B., and Angelidaki I. (2019) Urban biowaste valorization by coupling anaerobic digestion and single cell protein production. *Bioresource Technology* **290**, 121743. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121743>
- Kim S.K., Takeuchi T., Akimoto A., Furuita H., Yamamoto T., Yokohama M., and Murata Y. (2005) Effect of taurine supplemented practical diet on growth performance and taurine contents in whole body and tissues of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* **71(3)**, 627-632. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2005.01008.x>
- King'ori A., Tuitoek J., and Muiruri H. (1998) Comparison of fermented dried blood meal and cooked blood meal as protein supplements for growing pigs. *Tropical Animal Health and Production* **30(3)**, 191-196. <https://doi.org/10.1023/A:1005015804804>
- Latshaw J.D. Musharaf N., and Retrum R. (1994) Processing of feather meal to maximize its nutritional value for poultry. *Animal Feed Science and Technology* **47(3-4)**, 179-188. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90122-8](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90122-8)
- Liu S.M., Hsia M.P., and Huang C.M. (2006) Accumulation of butylin compounds in cobia *Rachycentron canadum* raised in offshore aquaculture sites. *Science of environment* **355(1-3)**, 167-175. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.02.025>
- Liao I.C., Huang T.S., Tsai W.S., Hsueh C.M., Chang S.L., and Leano E.M. (2004) Cobia culture in Taiwan: current status and problems. *Aquaculture* **237**, 155-165. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.007>
- Lu C.H., and Ku C.C. (2012) Effects of shrimp waste meal on growth performance and chitinase activity in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture Research* **44(8)**, 1190-1195 (2013). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03097.x>
- Lunger A.N., Craig S.R., and McLean E. (2006) Replacement of fish meal in cobia (*Rachycentron canadum*) diets using an organically certified protein. *Aquaculture* **257**, 393-399. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.010>

- Lunger A.N., McLean E., and Craig S.R. (2007a) The effects of organic protein supplementation upon growth, feed conversion and texture quality parameters of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* **264** (1-4), 342-352. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.12.012>
- Lunger A.N., McLean E., Gaylord T.G., and Kuhn D., and Craig S.R. (2007b) Taurine supplementation to alternative dietary proteins used in fish meal replacement enhances growth of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* **271**(1-4), 401-410. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.006>
- Luo Y., Ai Q., Mai K., Zhang W., Xu W., Zhang Y., and Liufu Z. (2013) Effects of dietary corn gluten meal on growth performance and protein metabolism in relation to IGF-I and TOR gene expression of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Ocean University of China* **12**(3), 418-426. <https://doi.org/10.1007/s11802-013-2021-3>
- Luo Y., Ai Q., Mai K., Zhang W., Xu W., and Zhang Y. (2012) Effects of dietary rapeseed meal on growth performance, digestion and protein metabolism in relation to gene expression of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* **368-369**, 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.013>
- Mach, D.T.N., Nguyen M.D., and Nortvedt R. (2010) Effects on digestibility and growth of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) fed fish or crab silage protein. *Aquaculture Nutrition* **16**(3), 305-312. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00666.x>
- Madsen C.K. and Brinch-Pedersen H. (2016) The antinutritional components of grains. *Reference Module in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00111-6>
- Mach D.T.N., and Norvedt R. (2013) Comparison of fillet composition and initial estimation of shelf life of cobia (*Rachycentron canadum*) fed raw fish or fish silage moist diets. *Aquaculture nutrition* **19**(3), 333-342. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2095.2012.00969.x/full>
- Meyer G.H., and Franks J.S. (1996) Food of cobia, *Rachycentron canadum*, from the north central Gulf of Mexico. *Gulf Research Reports* **9**(3), 161–167. <https://doi.org/10.18785/grr.0903.02>
- Miao S., Jen C.C., Huang C.T., and Hu S.H. (2009) Ecological and economic analysis for cobia *Rachycentron canadum* commercial cage culture in Taiwan. *Aquaculture international* **17**(2), 125-141. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10499-008-9185-7>
- Mo W.Y., Lau R.S.S., Kwok A.C.K., and Wong M.H. (2016) Use of soybean meal and papain to partially replace animal protein for culturing three marine fish species: fish growth and water quality. *Environmental Pollution* **219**, 815-820. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.059>
- Mydland L.T. (2015) Biotechnological transformation of non-food biomasses and agri-food rest raw materials into novel high-quality feed ingredient. *Foods of Norway*. Senter for forskningsdrevet innovasjon (Oral Presentation).

- Nasseri A.T., Rasoul-Amini S., Hossein-Morowvat M., and Younes G. (2011) Single cell protein: production and process. *American Journal of Food Technology* **6(2)**, 103-116. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.103.116>
- Nhu V.C., Nguyen H.Q., Le T.L., Tran M.T. Sorgeloos P., Dierckens K., Reinertsen H., Kjorsvik E., and Svennevig N. (2011) Cobia *Rachycentron canadum* aquaculture in Vietnam: recent developments and prospects. *Aquaculture* **315**, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.024>
- Njieassam E.S. (2016) Effects of using blood meal on the growth and mortality of catfish. *Journal of Ecosystems and Ecography* **6(3)**, 1-9. <https://doi.org/10.4172/2157-7625.1000204>
- NRC (National Research Council) (2011). Replacement of marine sources: effects of alternative ingredients and strategies on nutrition quality. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp* The National Academies Press, Washington D.C., USA.
- Oil World (2015) ISTA Mielke GmbH, Hamburg. <http://www.oilworld.de/>
- Olsen R.E., Soutana J., Langmyhr E., Mundheim H., Ringo E., Melle W., Malde M.K., and Hemre G.-H. (2006) The replacement of fish meal with Antarctic krill, *Euphausia superba* in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition* **12(4)**, 280-290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2006.00400.x>
- Overland M., Karlsson A., Torunn-Mydland L., Helge-Romarheim O., and Skrede A. (2013) Evaluation of *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **402-403**, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.016>
- Payne C.L.R., Scarborough P., Rayner M., and Nonaka K. (2015) A systematic review of nutrient composition data available for twelve commercially available edible insects, and comparison with reference values. *Trends in Food Science and Technology* **47**, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.012>
- Peng D., Hou X., Li Y., and Mu Y. (2019) The difference in development level of marine shellfish industry in 10 major producing countries. *Marine Policy* **106**, 103516. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2019.103516>
- Refstie S., Olli J.J., and Standal H. (2004) Feed intake, growth, and protein utilization by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture* **239**, 331-349. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.015>
- RFA (2008) Feeding the future: the role of the US ethanol industry in food and feed production. *Renewable Fuels Association* Washington DC, USA. http://ethanolrfa.org/page/-/objects/documents/2278/feed_co-products.pdf?nocdn=1
- Rodríguez Estrada U. (2018) *Rachycentron canadum* (Cobia) datasheet. *Aquaculture Compendium, Invasive species*. CABI (Centre of Agriculture and Bioscience International. United Kingdom (October 05, 2018).
- Rodríguez-Estrada U., Yasumaru F.A., Tacon A.G.J., and Lemos D. (2015). Cobia (*Rachycentron canadum*): A selected Annotated Bibliography on Aquaculture, General Biology and Fisheries 1967 – 2015.

- Reviews in fisheries science & aquaculture, **21(1)**, 1-97.
<http://dx.doi.org/10.1080/23308249.2015.1088821>
- Rosentrater K.A., and Verbeek C.J.R. (2017) Water absorption characteristics of extruded blends of corn gluten meal and distillers dried grains with solubles. *Food and Bioproducts Processing* **101**, 110-117.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.10.014>
- Saadiah I., Abol-Munafi A.M., and Utama C.M.C. (2011) Replacement of fishmeal in cobia (*Rachycentron canadum*) diets using poultry by-product meal. *Aquaculture Nutrition* **19(4)**, 637-648.
<https://doi.org/10.1007/s10499-010-9378-8>
- Salze G., McLean E., Battle P.R., Schwarz M.H., and Craig S.R. (2010) Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* **298(3-4)**, 294-299.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.003>
- Sartorelli S.A., Bertechini A.G., Fassani E.J., Kato R.K., and Fialho E.T. (2003) Nutrition and microbial evaluation of meat and bone meal produced in the state of Minas Gerais. *Brazilian Journal of Poultry Science* **5(1)**, 51-60. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2003000100007>
- Shaffer R.V., and Nakamura E.L. (1989) Synopsis of biological data on the Cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). *NOAA technical report NMFS – FAO fisheries synopsis* **153**.
<http://www.fao.org/docrep/017/ap958e/ap958e.pdf>
- Stengerg O.K., Holen E., Piemontese L., Liland N.S., Lock E-J., Espe M., and Belghit I. (2019) Effect of dietary replacement of fish meal with insect meal on *in vitro* bacterial and viral induce gene response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leukocytes. *Fish & Shellfish Immunology* **91**, 223-232.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.042>
- Suárez J.A., Tudela C., Davis D., Daugherty Z., Taynor M., Glass L., Hoening R., Buentello A., and Benetti D.D. (2013) Replacement of fish meal by a novel non-GM variety of soybean meal in cobia, *Rachycentron canadum*: ingredient nutrient digestibility and growth performance. *Aquaculture* **416-417**, 328-333. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.049>
- Tacon A.G.J., and Metian M. (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compound aquafeeds:trends and future prospects. *Aquaculture* **285**, 146-158.
http://www.nmfs.noaa.gov/aquaculture/docs/feeds/tacon_et al_global_fishmealoil_overview_2008.pdf
- Takagi S., Shimeno S., Hosokawa H., and Ukawa M. (2001) Effect of lysine and methionine supplementation to a soy protein concentrate diet for red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science* **67**, 1088-1096.
<https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00365.x>
- USDA (2016) Production, supply and distribution of rapeseed. *Foreign Agricultural Service*.
<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/>

- Voshell JR (2009) Sustaining America's Aquatic Biodiversity - Aquatic Insects Biodiversity and Conservation. *Virginia Cooperative Extension* 420– 531. <https://www.pubs.ext.vt.edu/420/420-531/420-531.html>
- Wang, G., Wu R., Xie J., and Yu D. (2005) Partial replacement for fish meal with soybean meal in feed for Cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Dalian Fisheries University* **20(4)**, 304-307.
- Warren M.B., Orélis-Ribeiro R., Ruiz C.F., Dang B.T., Arias C.R., and Bullard S.A. (2017) Endocarditis associated with blood fluke infections (Digenea: Aporocotylidae: *Psettarium anthicum*) among aquacultured cobia (*Rachycentron canadum*) from Nha Trang Bay, Vietnam. *Aquaculture* 468:549-557. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.009>
- Watson A.M., Buentello A., and Place A.R. (2014) Partial replacement of fishmeal, poultry by-product meal and soy protein concentrate with two non-genetically modified soybean cultivars in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* **434**, 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.003>
- Xu Y.Q., Zheng J.Z., and Ding Z.K. (2005) Cobia (*Rachycentron canadum*) culture and its formulated feed. *Fisheries Science / Shuichan Kexue* **25(1)**, 34-36.
- Yu, Y. (2004) Replacement of fish meal with poultry byproduct meal and meat bone meal in shrimp, tilapia and trout diets. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López M.G., Villarreal D., Scholz U., and González M. (2004) Avances en Nutrición Acuicola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 16-19 November, 2004. Hermosillo, Sonora, México. https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/VII/archivos/9YuYu.pdf
- Zhou H., Chen G., and Lin X.T. (2012) Effects of partial replacement of fish meal by three types of protein sources on growth performance and approximate compositions of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Fisheries Science / Shuichan Kexue* **31(6)**, 311-315.
- Zhou Q.C., Mai K.S., Tan B.P., and Liu Y.J. (2005) Partial replacement of fishmeal by soybean meal in diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture Nutrition* **11(3)**, 175-182. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2005.00335.x>
- Zhou Q.C., Tan B.P., Mai K.S., and Liu Y.J. (2004) Apparent digestibility of selected feed ingredients for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* **241(1-4)**, 441-451. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.044>
- Zhou Q.C., Zhao J., Li P., Wang H.L., Wang L.G. (2011) Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* **322-323**, 122-127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.042>

Efectos de la Inclusión Dietaria de *Ulva Clathrata* Sobre el Desempeño Reproductivo en Camarón Blanco *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1931) en Condiciones de Producción Comercial

Diana Cristina Corral-Rosales¹, Elena Palacios², Denis Ricque¹, L. Elizabeth Cruz-Suárez¹

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Programa Maricultura,. Cd Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66451. México
Tel/Fax +528183526380.

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur 23000, México. E-mail: dccr@hotmail.com, epalacio@cibnor.mx, lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

Resumen

En el presente estudio se presenta una revisión sobre los efectos generados por el consumo de una dieta fresca para maduración suplementada con 0.8% de harina de *Ulva clathrata* en comparación con una dieta control en un laboratorio de producción comercial durante 45 días. El estudio se realizó con 1200 reproductores de camarón *Litopenaeus vannamei* sobre los que se evaluaron efectos de la inclusión del alga sobre el rendimiento reproductivo, el agotamiento reproductivo, la histología y bioquímica de gónadas, músculo y hepatopáncreas en hembras. El consumo de *Ulva* aumentó 17.9% la producción de nauplios por hembra y mejoró 13.3% la tasa de eclosión. La alimentación con *Ulva* disminuyó significativamente el agotamiento reproductivo ocasionado por desoves múltiples. Las hembras alimentadas con *Ulva* presentaron ovocitos vitelogénicos tardíos y postvitelogénicos más grandes (+7, +15%, respectivamente), mayor área de cobertura por barras corticales, 35% más de lípidos en las gónadas, 84% más de 20:4n-6 en los acilglicéridos de las gónadas maduras y 30% más de 18:3n-3, 13% de 20:4n-6 y 10% de 22:6n-3 en los fosfolípidos de las gónadas maduras en comparación con los controles. En hepatopáncreas el 22:6n-3 aumentó 51% en los lípidos de reserva en hembras alimentadas con *Ulva* en comparación con los controles. Los carotenoides aumentaron 43% en las gónadas y cinco veces en el hepatopáncreas en hembras maduras alimentadas con *Ulva*. *Ulva clathrata* actúa como un aditivo multifuncional al ser fuente de compuestos (terpenos, esteroides, ácidos grasos, flavonoides, compuestos polifenólicos, pigmentos y polisacáridos sulfatados) con diversas propiedades biológicas que ejercen acciones principalmente sobre la acumulación y el transporte de lípidos, pigmentos, esteroides, y polifenoles durante la vitelogénesis. Estos compuestos también funcionan evitando la oxidación de moléculas claves en la fisiología reproductiva y como precursores hormonales y vitelogénicos. La suplementación de la dieta fresca para maduración con *Ulva* es una estrategia de alimentación rentable que mejora la capacidad reproductiva,

disminuye el agotamiento en hembras con desoves múltiples, mejora la acumulación y el transporte de compuestos bioquímicos y aporta compuestos antioxidantes durante la producción comercial.

Palabras clave: Capacidad reproductiva, ácidos grasos, lípidos, vitelogénesis, antioxidantes, agotamiento reproductivo.

1. Introducción

La acuicultura es una actividad productiva con un gran potencial económico. En esta actividad, el manejo adecuado de reproductores para obtener alta producción de postlarvas es determinante para el éxito del cultivo. Sin embargo, a pesar de que se cuenta con una avanzada tecnología para la producción de postlarvas, el progreso en el desarrollo de los alimentos para reproductores ha sido lento. Actualmente, la mayoría de los criaderos comerciales usan para promover la maduración en reproductores, alimentos a base de organismos marinos ya sean frescos o congelados. Estos incluyen calamares, diversos moluscos (mejillones, ostiones y almejas), poliquetos marinos, crustáceos (langostino), biomasa de *Artemia* (Coman *et al.*, 2007; Hoa *et al.*, 2008; Chimsung, 2014). En particular, los poliquetos han sido considerados por diversos autores como la mejor dieta para maduración (Lytle *et al.*, 1990; Browdy 1992; Naessens *et al.*, 1997). En camarón tigre el consumo de poliquetos (*Perinereis nuntia*) genera mejoras en el crecimiento, la supervivencia y el rendimiento de los espermatozoides en reproductores domesticados *Penaeus monodon* (Leelatanawit *et al.*, 2014). Además, los poliquetos contienen altos niveles de prostaglandina E₂ que tiene un efecto positivo en la maduración de los ovocitos, especialmente durante la maduración tardía y el período de ovulación (Meunpol *et al.*, 2010). La causa del efecto positivo de estos ingredientes sobre la capacidad reproductiva se atribuye entre otros a su alto contenido de aminoácidos, ácidos grasos altamente insaturados (especialmente ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), esteroides (Cavalli *et al.*, 1997; Wouters *et al.*, 2001; Coman *et al.*, 2007) y a la presencia de sustancias con actividad hormonal (Wouters *et al.*, 2002, Meunpol *et al.*, 2007). Algunos requerimientos nutricionales de reproductores han sido inferidos a partir de la composición de estos ingredientes frescos que promueven con éxito la

maduración (Wouters *et al.*, 2002; Meunpol *et al.*, 2005). No obstante, estos ingredientes también presentan algunas desventajas: son costosos, su disponibilidad es impredecible, su calidad nutricional puede variar con la especie, edad, época y lugar de captura y pueden ser vectores de patógenos. Los ingredientes frescos generalmente son congelados para su almacenamiento (Galgani *et al.*, 1989; Cavalli *et al.*, 1997), por lo que su valor nutricional puede deteriorarse a causa de lixiviación (Álvarez *et al.*, 1989), pérdidas de humedad por sublimación, absorción y redistribución de la humedad, recristalización del hielo y pérdidas por goteo que se dan durante la descongelación (Franks, 1983, Conchillo *et al.*, 2005). El principal proceso perjudicial que tiene lugar durante el almacenamiento por congelado es la oxidación de lípidos (Bhattacharya *et al.*, 1988; Farouk *et al.*, 1988). Estas reacciones oxidativas se inician en los fosfolípidos que son altamente susceptibles por contener grandes cantidades de HUFA (Higgins *et al.*, 1998). Además, su uso requiere mucha mano de obra y afecta significativamente la calidad del agua por la lixiviación de compuestos solubles en agua.

Diferentes estudios han mostrado que la calidad y eficiencia de los alimentos frescos pueden mejorarse al complementarlos con dietas peletizadas enriquecidas con algunos compuestos o con ingredientes esenciales para la maduración como ácidos grasos, esteroides, pigmentos, vitaminas antioxidantes, microalgas, *Spirulina* (Hoa *et al.*, 2008) (Tabla 1).

Tabla 1. Aditivos evaluados en dietas peletizadas para maduración que mejoran la capacidad reproductiva en camarón.

Especie	Componente	Efecto	Autor
<i>P. monodon</i>	Carotenoides	Incrementan la frecuencia del desove, la fertilidad y fecundación, aumenta el conteo de espermatozoides	Quinitio <i>et al.</i> (1996)
<i>P. monodon</i>	ARA, EPA y DHA	Incrementan el número de huevos fertilizados y la tasa de eclosión	Millamena (1989)
<i>P. monodon</i>	Astaxantina y HUFA	Incrementan la frecuencia del desove, la fertilidad y fecundación	Paibulkichakul <i>et al.</i> (2008)
<i>P. monodon</i>	ARA	Aumenta los desoves por hembra y el número de huevos por desove	Coman <i>et al.</i> (2011)
<i>P. monodon</i>	ARA	Mejora el desarrollo del huevo	Coman <i>et al.</i> (2011)
<i>P. monodon</i>	Vitamina C y E	Aumenta del contenido de PUFA en el hepatopáncreas y en ovocitos (III)	Usman <i>et al.</i> (2019)
<i>P. monodon</i>	Microalgas	Aumenta la tasa de fagocitosis y actividad de superóxido dismutasa (SOD), mejora la salud de los reproductores	Li <i>et al.</i> (2016)
<i>L. vannamei</i>	Fosfolípidos y HUFA	Incrementan la frecuencia del desove, la fertilidad y fecundación	Cahu <i>et al.</i> (1994)
<i>L. vannamei</i>	ARA	Mejora los tiempos de metamorfosis de nauplios a zoea y aumenta la tolerancia a diferentes salinidades	Xu <i>et al.</i> (2017)
<i>P. indicus</i>	Vitamina C y E	Incrementan la frecuencia del desove, la fertilidad y fecundación	Cahu <i>et al.</i> (1995)
<i>P. esculentus</i>	Carotenoides	Mejor rendimiento reproductivo, la tasa de eclosión e incrementa el contenido de astaxantina en el ovario.	Dall <i>et al.</i> (1995)
<i>E. sinensis</i>	Fosfolípidos y HUFA	Incrementan los huevos fertilizados y tasas de eclosión	Wu <i>et al.</i> (2007)
<i>N. davidi</i>	<i>Spirulina</i>	Mejora el crecimiento, la supervivencia y el rendimiento reproductivo en particular la fecundidad en hembras	Kohal <i>et al.</i> (2018)

ARA: ácido araquidónico (20:4n-6); EPA: ácido eicosapentaenoico (20:5n-3); DHA: ácido docosahexaenoico (22:6n-3).

Adicionalmente, otros estudios han mostrado mejoras en la calidad de la dieta fresca al complementarse directamente con aditivos o ingredientes que tienen en común un fuerte poder antioxidante (por su alto contenido de pigmentos, polisacáridos sulfatados, polifenoles, vitaminas, etc.) como lo son la paprika, la espirulina, el alginato de sodio, el polen y el biofloc (Tabla 2).

Tabla 2. Aditivos suplementados directamente en dietas frescas para maduración con efecto sobre la capacidad reproductiva del camarón.

Aditivo	Especie	Concentración	Resultado	Autor
Paprika	<i>P. vannamei</i>	2 g de paprika por 100 g de calamar	Aumenta la calidad del nauplio	Wyban <i>et al.</i> (1997)
Spirulina	<i>F. indicus</i>	(30 g de <i>Spirulina</i> por 1000 g de calamar)	Aumenta los pigmentos en los huevos y en las larvas, mejora la calidad del desove (número de desoves, número de nauplios por desove, y viabilidad de los nauplios).	Regunathan y Wesley (2006)
Alginato de sodio	<i>P. monodon</i>	200 mg kg ⁻¹ inyectados en poliqueto vivo	Mejora el rendimiento reproductivo y aumenta la supervivencia en larvas.	Chung <i>et al.</i> (2011)
Polen Paprika	<i>F. paulensis</i>	2% de la dieta fresca	Mejora en la concentración de esperma y prevención de la melanización	Braga <i>et al.</i> (2013)
*Biofloc	<i>L. stylirostris</i>		Mejora la capacidad reproductiva	Cardona <i>et al.</i> (2016)
	<i>F. duorarum</i>			Emerenciano <i>et al.</i> (2017)
	<i>L. vannamei</i>			Braga <i>et al.</i> (2018).

*Biofloc: agregados microbianos como bacterias, microalgas, protozoos y otros (Avnimelech, 2009).

Ulva como ingrediente multifuncional en alimentos para camarón

El alga *Ulva clathrata* es una macroalga verde producida por acuicultura con una tecnología de cultivo estandarizada que presenta una composición bioquímica de macro y micronutrientes como carotenoides (β -caroteno, xantofilas, luteína, zeaxantina), esteroides, ácidos grasos omega 3, compuestos fenólicos, polisacáridos sulfatados (ulvan) y vitaminas (A, C, E) (Cruz-Suárez *et al.*, 2009b; Peña-Rodríguez *et al.*, 2011; Cruz-Suárez *et al.*, 2013). La inclusión de 2 a 4% de *U. clathrata* en alimento peletizado para crecimiento (engorda) de camarón mejora la calidad de pellet (estabilidad en agua, capacidad de retención de agua y textura), aumenta el consumo de alimento, mejora la eficiencia de alimentación, la tasa de

crecimiento, la calidad del producto final (pigmentación y contenido de colesterol) (Cruz-Suárez *et al.* 2009a,b; 2010), mejora la digestibilidad de proteína en juveniles de *L. vannamei* (Vargas-Cardenas *et al.*, 2015) y aumenta la capacidad de asimilación de nutrientes de acuerdo con estudios de isotopos estables (Gamboa-Delgado *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que la suplementación de *U. clathrata* en la dieta durante la etapa de crecimiento estimula el sistema inmune y los genes involucrados en el metabolismo de lípidos y procesos de oxidación (Elizondo-Reyna *et al.*, 2016) y modifica el microbioma fecal del camarón que la consume (Salce datos no publicados). En estudios *in vitro* se ha demostrado que el alga *Ulva clathrata* y en general las ulvaceas tienen compuestos con actividad antioxidante, inmunoestimulante, antibacteriana, antiviral y *en vivo* su consumo incrementa hemograma, índice de aglutinación, tasa de fagocitosis, remoción de bacterias, actividad bactericida en el suero, aumenta la actividad de la profenol oxidasa y la sobrevivencia en camarones desafiado (Cruz-Suárez *et al.*, 2013). También existen antecedentes en donde reportan que la inclusión de *Ulva* en dietas para reproductores de erizos, ratas y conejos produce un efecto positivo en la maduración (Okab *et al.*, 2013; Prato *et al.*, 2018; Ghareeb *et al.*, 2019) (Tabla 3). En camarón *L. vannamei* nuestro grupo de investigación, en una primera etapa, demostró el efecto positivo de la inclusión del alga *Ulva clathrata* sobre parámetros productivos en dos laboratorios comerciales (Corral-Rosales *et al.*, 2018a). Sin embargo, en esa primera fase no se profundizó sobre el estudio de los posibles mecanismos de acción.

Tabla 3. Estudios sobre efecto de *Ulvaceas* en dietas para maduración de diferentes especies

Organismo	Alga	Efecto	Autor
Conejos	<i>Ulva lactuca</i> 1% y 2%	Mejora el rendimiento reproductivo y las características de fertilidad del semen	Okab <i>et al.</i> (2013)
Ratas	Extracto metanólico de <i>Ulva lactuca</i>	Aumenta la actividad antioxidante y mejora la calidad del esperma	Ghareeb <i>et al.</i> (2019)
Erizos	<i>Ulva sp.</i> fresca 50%	Mejora la calidad nutricional de las gónadas principalmente el contenido de HUFA	Prato <i>et al.</i> (2018)
Camarón	0.8% de harina de <i>Ulva</i> en la dieta fresca	Mejora la capacidad reproductiva, aumenta la producción de nauplios y huevos y mejora la tasa de eclosión.	Corral-Rosales <i>et al.</i> (2018a)

Considerando los antecedentes mencionados y el potencial multifuncional que presenta el alga *Ulva clathrata*, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos en capacidad reproductiva y los cambios bioquímicos e histológicos generados por la inclusión del alga 0.8% en forma de harina en la fracción calamar de una dieta fresca para maduración en un laboratorio de producción comercial con el fin de identificar posibles mecanismos de acción en camarones *Litopenaeus vannamei*.

2. Metodología

El origen, la crianza, el muestreo y los análisis de reproductores se describen en Corral-Rosales *et al.*, 2018a, 2018b, 2019). En resumen: el alga *U. clathrata* utilizada fue cultivada en San Quintín, Baja California, México, bajo una tecnología patentada desarrollada para producción de alto rendimiento y bajo costo (WO 2004093525 A2 Moll 2004).

El experimento fue llevado a cabo con un total de 1200 camarones *Litopenaeus vannamei* (Boone) proporcionados por el laboratorio de larvas Granmar ubicado en La Paz, Baja California Sur. Se usaron 600 hembras (53 ± 8 g) marcadas con anillos oculares y ablacionadas del pedúnculo y 600 machos (36 ± 7 g) seleccionados genéticamente para alto crecimiento (stock local) para el ciclo de producción experimental (45 días) que se

distribuyeron en cuatro tanques rectangulares de maduración de 30 m² con diez animales por m². La temperatura, salinidad y oxígeno promedio fueron 29.6 ± 1.5 °C, 32.6 ± 0.5 mg L⁻¹ y 5.3 ± 0.9 mg L⁻¹, respectivamente (media $\pm$ DE). El fotoperiodo fue 14 h de luz: 10 h de oscuridad con un sistema de luz artificial. La proporción de hembras y machos fue de 1:1 y el intercambio diario de agua fue del 250%. Los camarones fueron alimentados con una dieta Control (dos tanques) o dieta enriquecida con *Ulva* (dos tanques). La dieta Control estuvo compuesta de invertebrados congelados frescos en base a un régimen estándar de alimentación para maduración: calamar (40%), poliquetos (10%), mejillón (40%) y krill (10%). El calamar y el mejillón se molieron en un molino de carne (Torrey, EE. UU.) mientras aún estaban congelados. Todos los ingredientes se descongelaron a temperatura ambiente antes de pesarlos y distribuirlos en cada tanque. La dieta experimental con *Ulva* consistió en la dieta Control más el suplemento de harina de *Ulva clathrata* (10% de humedad) de 2% en la fracción de calamar (78% de humedad). La inclusión de 2% de *Ulva* sobre el calamar fresco corresponde al 3.8% de la dieta basado en el peso seco de todos los ingredientes o bien el 0.8% considerando la *Ulva* seca y el resto de los ingredientes de la dieta húmedos. Tanto la dieta Control como la experimental se dividieron en seis porciones diarias; las fracciones de 40% de calamar y mejillón fueron divididas en dos porciones de 20%. El peso total de las seis porciones diarias fue equivalente al 25% de la biomasa de camarón presente en el tanque de maduración correspondiente.

Al final del ciclo de producción (45 días) fueron muestreadas 12 hembras por tratamiento, seleccionadas en 4 etapas de maduración diferentes. Las hembras enteras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis. Las muestras de gónada, hepatopáncreas y músculo de hembras congeladas se diseccionaron sobre una placa congelada, las muestras de los tejidos diseccionados fueron preparadas para análisis bioquímicos, ácidos grasos y carotenoides como se describe en Corral-Rosales *et al.* (2018b, 2019).

3. Resultados y discusión

3.1. Parámetros reproductivos de hembras.

El desempeño reproductivo de hembras *L. vannamei* alimentadas con harina de *Ulva* en relación con el número de desoves se presenta en la Figura 1.

Varios trabajos de investigación han demostrado que el potencial reproductivo en hembras está asociado a la sobrevivencia, frecuencia de desoves, el número de huevos (fecundidad), el porcentaje de fertilización, el porcentaje de eclosión, el número de nauplios, la composición bioquímica.

Durante el tiempo de experimentación la mortalidad diaria de las hembras ablacionadas del grupo con *Ulva* fue significativamente menor (1.11 vs. 2.25 hembras/día/tanque, $P < 0.01$) en comparación con la dieta Control. Esto significa que el consumo de *Ulva* disminuyó los efectos negativos de desgaste causados por la ablación que se ven reflejados en un incremento en la mortalidad de hembras (Palacios *et al.*, 2000) y en una reducción en el número de huevos y en la viabilidad de los nauplios después de determinado tiempo (Palacios *et al.*, 1999b). Este efecto también se ha reportado al incluir alginato de sodio en poliquetos de la dieta fresca sobre *Penaeus monodon* (Chung *et al.*, 2011). La forma de acción de la *Ulva* podría explicarse por un posible aumento en la respuesta inmune (Elizondo-Reyna *et al.*, 2016), y en la capacidad antioxidante en los reproductores debido a que el alga es rica en carotenoides (luteína, clorofila, y zeaxantina) (Peña-Rodríguez *et al.*, 2011) que pueden ser metabolizados a astaxantina en el tejido del camarón (Cruz-Suárez *et al.*, 2010). La astaxantina acumulada por el camarón en su forma libre y esterificada puede reducir la oxidación, y además se ha reportado que promueve la maduración ovárica y el desove exitoso en *P. monodon* cuando se suministra en la dieta bajo condiciones experimentales (Pangantihon *et al.*, 1998). *Ulva* también es rica en polisacáridos como el ulvan (equivalente al alginato en algas pardas), polisacárido que es bien conocido por sus actividades antioxidantes e inmunoestimulantes (Yaich *et al.*, 2017; Morelli *et al.*, 2017; Pangestuti y Kurnianto, 2017; Sun y Sheng, 2018).

El tratamiento con *Ulva clathrata* también aumentó la producción de huevos y nauplios por desove 5% y 18% respectivamente, además la inclusión del alga en el alimento fresco mejoró la tasa de eclosión y la producción de nauplio 13% y 23% respectivamente. La capacidad reproductiva de reproductores alimentados con *Ulva* en la dieta fresca se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Desempeño reproductivo de reproductores *L. vannamei* alimentados con una dieta Control y una dieta experimental suplementada con harina *U. clathrata* en el laboratorio de larvas comercial durante el periodo experimental de 45 días

Parámetros	Dieta	Dieta	ANOVA
	Control	Ulva	
Numero de desoves/día/tanque	12 ± 1	14 ± 1	NS
Huevos totales producidos/ hembra (x10 ³)	212 ± 2	223 ± 2	<i>P</i> <0.05
Nauplios producidos/hembra (x10 ³)	128 ± 2	151 ± 2	<i>P</i> <0.001
Tasa de eclosión (%)	60 ± 1	68 ± 1	<i>P</i> <0.001
Mudas/día/tanque (piezas)	18.39 ± 1.2	16.39 ± 1.2	NS
Mortalidad/día/tanque (Hembras)	2.25 ± 0.3	1.11 ± 0.3	<i>P</i> <0.01

Cuando se realizó un seguimiento individual de los efectos generados en las hembras reproductoras alimentadas con *Ulva*, hubo mayor número de hembras con desoves consecutivos (Fig. 1A). La producción de nauplios por desove en relación con el número total de desoves consecutivos reportó una disminución significativa en el tratamiento control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para la producción de nauplios en relación con el número de desove en el grupo *Ulva* (Fig. 1B). Los camarones que consumieron *Ulva* durante el período experimental tuvieron un número significativamente mayor de desoves totales (*P*<0.05) que los camarones alimentados con una dieta control (hembras que desovaron una vez: 109 vs. 114; 2 veces = 59 vs. 66; 3 veces = 33 vs. 38; 4 veces = 22 vs. 33; 5 veces = 10 vs. 11; 6 veces = 0 vs 6). Se encontró un resultado similar para el número de nauplios por desove, con una mayor producción de nauplios totales en las hembras alimentadas con *Ulva* (Desove 1=128 vs. 128; desove 2= 107 vs 124; desove 3= 99 vs. 110; desove 4= 71 vs. 85; desove 5= 75 vs. 114 nauplios por desove x10³). La tasa de eclosión disminuyó constantemente en los camarones alimentados con la dieta control, con

diferencias significativas en el quinto desove, mientras que los camarones alimentados con *Ulva* mantuvieron una tasa de eclosión similar a lo largo de los desoves (Fig. 1). La disminución en la producción de nauplio por número de desove reportada para el grupo control es una manifestación del agotamiento reproductivo típico que se presenta en reproductores *L. vannamei* al final del ciclo de producción comercial (Palacios *et al.*, 1998; 1999a). Se ha teorizado que el agotamiento reproductivo podría ser el resultado del aumento de la hormona inhibidora de la gónada (GIH) de la glándula restante, para compensar la reducción de GIH inmediatamente después de la ablación, con la reducción concomitante en la producción de desove y nauplios (Palacios *et al.*, 1999b). Los reproductores silvestres, incluso cuando son ablacionados, no presentan un agotamiento reproductivo tan evidente, presentan más desoves consecutivos y la producción de nauplios no se ve tan afectada por reproducciones consecutivas en comparación con los reproductores domesticados (Palacios *et al.*, 1999c). Los camarones alimentados con *Ulva* al igual que los reproductores silvestres no presentaron un agotamiento tan evidente. Probablemente, *Ulva* aporta algún (o algunos) micronutriente (s), al (los) que tienen acceso los camarones silvestres en el medio natural, disminuyendo así el agotamiento. *Ulva* contiene alto contenido de polisacáridos sulfatados (fibra) y minerales. La fibra puede afectar la digestión al mejorar el impacto sobre la motilidad y las tasas de digestión del intestino delgado y también puede afectar las secreciones exocrinas del páncreas y el hígado (Chater *et al.*, 2015). También puede modificar la microbiota intestinal en el tracto gastrointestinal (Slavin, 2013) y promover la producción de productos finales fermentativos, actuar como agente emulsionante y antioxidante y modificar el contenido de proteína enlazadora de beta-glucanos (BGBP) que tiene un doble rol: en el transporte de lípidos y en la respuesta inmune (Li *et al.*, 2018). Existen otros micronutrientes que *Ulva* puede suministrar para aumentar el rendimiento reproductivo, como minerales, lípidos y antioxidantes. Yaich *et al.* (2011) encontraron altos contenidos de magnesio en *Ulva*; esto es interesante porque los camarones presentan bajos niveles de magnesio después de un ciclo reproductivo en laboratorio comercial en comparación con el camarón silvestre (Méndez *et al.*, 1999).

Otros aditivos ricos en ácidos grasos (PUFA), carotenoides y compuestos antioxidantes han demostrado tener efectos similares a los obtenidos con *Ulva*, por ejemplo se sabe que algunos lípidos, como los HUFA, aumentan la calidad del huevo y la eclosión (Xu *et al.*, 2017); los carotenoides contenidos en *Spirulina* aumentan la producción de huevos en 2%, producción de nauplios 5% y tasa de eclosión 2% (Regunathan y Wesley, 2006); el alginato de sodio incluido en poliquetos aumenta la supervivencia en larvas, la producción de nauplios 17% y la tasa de eclosión 8% (Chung *et al.*, 2011). El biofloc, un sistema con agregados de microbios como bacterias, microalgas, protozoos y otros, junto con detritos que incluyen partículas orgánicas (Avnimelech, 2009) mejora la capacidad reproductiva, el sistema inmune y la actividad antioxidante (Cardona *et al.*, 2016; Emerenciano *et al.*, 2017; Braga *et al.*, 2018).

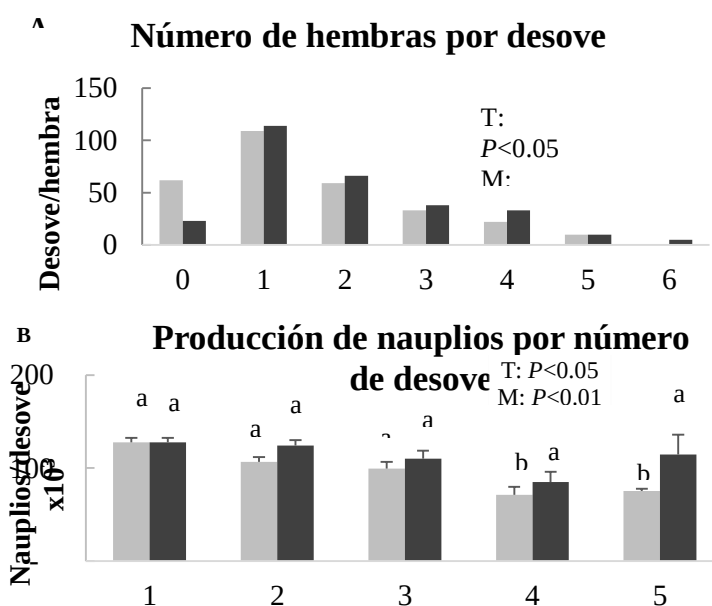


Figura 1. Desempeño reproductivo de hembras *Litopenaeus vannamei* alimentadas con harina de *Ulva clathrata* (gris oscuro) vs. control (gris claro) en relación con el número de desoves: A) Número de hembras que presentaron cierto número de desoves durante el período experimental de 45 días; B) Nauplios por número de desove. Los resultados se expresaron como medias $\pm$ SE. T=Tratamiento; M=Etapa de maduración

3.2. Histología e histoquímica de gónadas

La vitelogénesis temprana ocurre cuando las reservas bioquímicas almacenadas en diferentes tejidos se movilizan a la gónada, mientras que la vitelogénesis tardía ocurre cuando las reservas bioquímicas del alimento se incorporan a las lipoproteínas, llamadas vitelogeninas y se transportan a la gónada, donde la vitelogenina se absorbe por endocitosis y se almacena como vitelina (Charniaux, 1985; Tsukimura, 2001). En la Figura 2 se muestra el desarrollo gonadal de hembras *L. vannamei* usando tinción con hematoxilina-eosina.

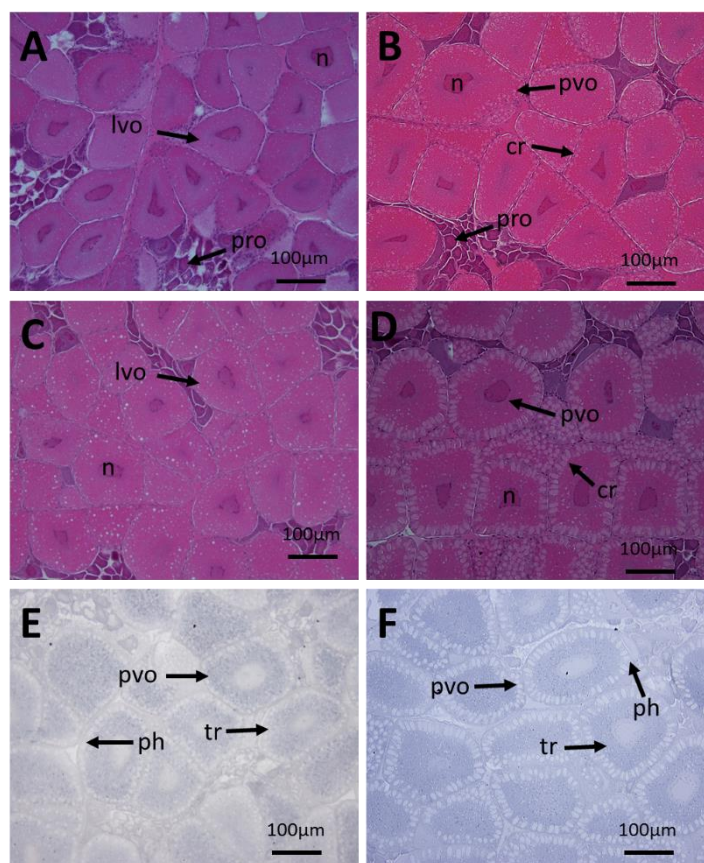


Figura 2. Micrografías del desarrollo gonadal de hembras de *L. vannamei* utilizando tinción con Hematoxilina-eosina. A) Control: ovario en vitelogénesis avanzada en estadio III con ovocitos previtelogénicos (pro) y ovocitos vitelogénicos tardíos (lvo). B) Control: ovario con ovocitos postvitelogénicos en estadio IV (pvo). C) *Ulva*: en vitelogénesis avanzada en estadio III con ovocitos previtelogénicos y ovocitos en vitelogénesis exógena o tardía (lvo). IV D) *Ulva*: ovocitos postvitelogénicos en estadio IV (pvo); barras corticales (cr); n = núcleo; E) y F) Sudán Negro tr=triglicéridos ph = fosfolípidos.

En *P. japonicus* (Yano y Chinzei, 1987), *M. rosenbergii* (Lee y Chang, 1997), *P. aztecus* y *P. setiferus* (Castille y Lawrence, 1989) hay un rápido crecimiento de ovocitos durante las últimas etapas de la vitelogénesis relacionado con el aumento en el contenido de proteína en las gónadas maduras. En la evaluación con el alga, el consumo de *Ulva* aumentó el tamaño de los ovocitos vitelogénicos tardíos ($17,002 \mu\text{m}^2$ *Ulva* vs. $14,434 \mu\text{m}^2$ grupo control, $P<0.01$) y ovocitos postvitelogénicos ($30,569 \mu\text{m}^2$ *Ulva* vs. $23,273 \mu\text{m}^2$ control, $P<0.01$) (Fig. 3A), presumiblemente, como resultado de una mayor acumulación de vitelina (Corral-Rosales *et al.*, 2018b). Al finalizar la vitelogénesis, los ovocitos alcanzan la etapa final de la maduración que se caracteriza por la aparición de cuerpos en forma de bastoncillos, llamados barras corticales, localizados radialmente alrededor de la periferia de las membranas plasmáticas del ovocito (Lynn y Clark, 1987; Yano, 1988; Pongtippatee-Taweepreda *et al.*, 2004). La formación de barras corticales en ovocitos postvitelogénicos es la última etapa de maduración y ocurre justo antes del desove (Tan-Fermin y Pudadera, 1989). Las barras corticales están formadas principalmente por proteínas (70-75%) y carbohidratos (25-30%) (Lynn y Clark, 1987), asociadas a varias glucoproteínas que se secretan durante la liberación de ovocitos y ayuda a la reacción acrosómica de los espermatozoides, y pueden tener actividad antimicrobiana (Kruevaisayawan *et al.*, 2007). Con el consumo de *Ulva*, la longitud cortical en los ovocitos postvitelogénicos fue mayor en las hembras control (Figura 3C). Por el contrario, el área total cubierta por las mucinas corticales contenidas en las barras corticales de los ovocitos postvitelogénicos, aumentó con el consumo de *Ulva* (Fig. 3D). Es posible que el alto contenido de polisacáridos sulfatados en *Ulva* afecte directamente la formación de barras corticales, lo que puede aumentar la eclosión al reducir la poliespermia y la viabilidad de los nauplios al reducir la contaminación microbiana.

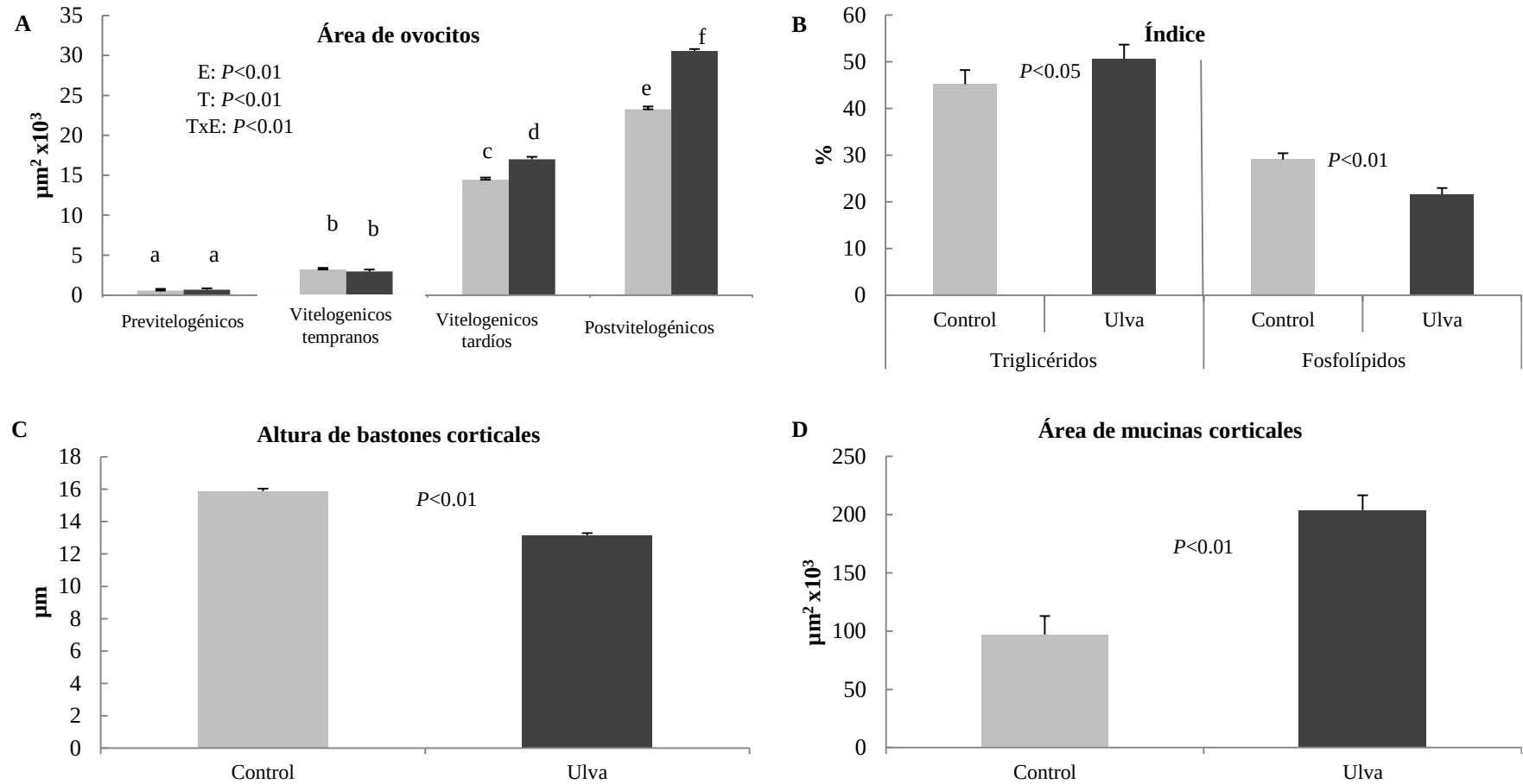


Figura 3. A) Área de ovocitos (μm^2) en relación con los estadios vitelogénicos (Previtelogénesis, vitelogénesis temprana, vitelogénesis tardía, postvitelogénesis) durante el desarrollo ovárico de hembras *L. vannamei* alimentadas con una dieta de control (gris claro) o con *Ulva* (gris oscuro) E = Etapa de maduración, T = Tratamiento, TxE = Interacción. Valores analizados usando un ANOVA anidado. B) Histoquímica (índice de triglicéridos o fosfolípidos) en ovocitos postvitelogénicos. Valores analizados utilizando un ANOVA de un factor. C) Longitud de las varillas corticales (μm) en ovocitos postvitelogénicos. D) Área de mucinas corticales (μm^2) en ovocitos postvitelogénicos.

3.3.Composición química de gónadas, hepatopáncreas y músculo de hembras

Analizando la composición bioquímica de gónadas, hepatopáncreas y músculo en hembras alimentadas con o sin *Ulva* en la dieta (Tabla 5), el consumo de *Ulva* aumentó los niveles de lípidos en las gónadas (efecto global del tratamiento: 26.9 ± 2.6 vs. 35.8 ± 3.2 mg g⁻¹ dw), sin afectar la composición bioquímica del hepatopáncreas y el músculo. Si bien se demostró un efecto significativo en los ovocitos vitelogénicos tardíos mediante histología, aparentemente *Ulva* afectó los procesos tempranos y tardíos, ya que los niveles de lípidos y proteínas aumentaron en la gónada desde la etapa I de maduración.

Tabla 5. Composición bioquímica (mg g⁻¹ dw) de la gónada de hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con una dieta con o sin *Ulva*, en relación con la etapa de maduración, en un período experimental de 45 días (medias $\pm$ ES).

Tratamiento		M I	M II	M III	M IV	T	M	TxM
<i>Gónadas</i>								
Proteínas	Control	225 $\pm$ 32.6b	241.4 $\pm$ 23.9ab	322 $\pm$ 29.6ab	313.5 $\pm$ 16.9ab	NS	<0.05	NS
	<i>Ulva</i>	284.9 $\pm$ 32.6ab	246.7 $\pm$ 16.6ab	353.7 $\pm$ 23.6a	338.7 $\pm$ 25.6a			
CHO	Control	5.3 $\pm$ 0.9ab	4.2 $\pm$ 0.8ab	3.4 $\pm$ 0.3b	6.5 $\pm$ 1.1a	NS	<0.05	NS
	<i>Ulva</i>	5.3 $\pm$ 1.7ab	3.7 $\pm$ 0.6b	6.7 $\pm$ 1.3a	6.4 $\pm$ 0.8a			
Lípidos	Control	22.8 $\pm$ 3.2b	24.9 $\pm$ 3.3b	30.1 $\pm$ 6.0ab	30.4 $\pm$ 4.2ab	<0.05	NS	NS
	<i>Ulva</i>	32.6 $\pm$ 4.9ab	26.7 $\pm$ 8.1ab	39.6 $\pm$ 6.1ab	40.9 $\pm$ 4.9a			
<i>Hepatopáncreas</i>								
Proteínas	Control	197.2 $\pm$ 19.8	206.5 $\pm$ 17.9	220.3 $\pm$ 23.5	220.3 $\pm$ 14.8	NS	NS	NS
	<i>Ulva</i>	198.4 $\pm$ 16.1	176.9 $\pm$ 16.4	193.3 $\pm$ 15.6	212.6 $\pm$ 13.2			
CHO	Control	11.6 $\pm$ 1.4	10.9 $\pm$ 1.1	14.1 $\pm$ 0.8	12.4 $\pm$ 1.3	NS	<0.05	NS
	<i>Ulva</i>	13.3 $\pm$ 1.2	8 $\pm$ 0.9	11.8 $\pm$ 1.5	12.8 $\pm$ 1.4			
Lípidos	Control	33.2 $\pm$ 4.8	27.9 $\pm$ 3.8	28.2 $\pm$ 7.5	26.5 $\pm$ 4.3	NS	NS	NS
	<i>Ulva</i>	26 $\pm$ 6.1	17 $\pm$ 4.3	23.4 $\pm$ 6.1	34.8 $\pm$ 4			
<i>Músculo</i>								
Proteínas	Control	260.3 $\pm$ 14.3	250.2 $\pm$ 6.4	257.5 $\pm$ 4.3	242.5 $\pm$ 9.3	NS	NS	NS
	<i>Ulva</i>	255 $\pm$ 17.6	272.4 $\pm$ 14.3	254.5 $\pm$ 17.6	270.4 $\pm$ 12.4			
CHO	Control	3.7 $\pm$ 0.6	3.1 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 0.8	3.4 $\pm$ 0.6	NS	NS	NS
	<i>Ulva</i>	3.2 $\pm$ 0.7	3.8 $\pm$ 0.6	3.7 $\pm$ 0.7	3.5 $\pm$ 0.5			
Lípidos	Control	6.9 $\pm$ 0.8	4.9 $\pm$ 0.7	6.2 $\pm$ 1.2	4.6 $\pm$ 0.8	NS	NS	NS
	<i>Ulva</i>	4.9 $\pm$ 1	6 $\pm$ 0.8	5.1 $\pm$ 1	5.1 $\pm$ 0.5			

T=Tratamiento; M=Etapa de maduración. CHO = carbohidratos. NS = sin diferencia significativa ($P>0.05$). Los valores con letras diferentes en la misma fila son significativamente diferentes.

Ulva no está suministrando más proteína en comparación con la dieta control, por lo que el efecto probablemente se asocia a otros mecanismos, como una mayor asimilación de nutrientes y transferencia de reservas bioquímicas del hepatopáncreas a la gónada en la vitelogénesis, aumento de la producción de vitelogenina y estimulación hormonal.

3.4. Ácidos grasos en gónadas

El consumo de *Ulva* aumentó el contenido de ácidos grasos 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7, 20:1n-7, 20:4n-6, suma de saturados y MUFA en la fracción neutra de las gónadas (Tabla 6).

Tabla 6. Perfil de principales ácidos grasos de la fracción neutra de gónadas (% del total, media $\pm$ ES) de reproductores hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con o sin *Ulva* en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días

Estadio	Inmadura (n=12)			Madura (n=12)			ANOVA		
Tratamiento	Control		Ulva	Control		Ulva	E	T	ExT
16:0	28.9	± 2.0a	38.3 ± 2.3b	25.6	± 2.0a	27.1 ± 2.0a	**	*	NS
18:0	7.3	± 0.7ab	9.9 ± 0.8b	6.9	± 0.7ab	6.7 ± 0.7a	*	NS	NS
16:1n-9	1.4	± 0.1a	1.0 ± 0.2a	1.5	± 0.1b	1.6 ± 0.1b	*	NS	NS
16:1n-7	10.7	± 0.8a	6.1 ± 0.9b	11.7	± 0.8a	9.8 ± 0.8a	*	**	NS
18:1n-9	15.9	± 0.7a	10.5 ± 0.9b	16.0	± 0.7a	13.5 ± 0.7ab	NS	**	NS
18:1n-7	5.1	± 0.3a	3.3 ± 0.3b	5.4	± 0.3a	5.1 ± 0.3a	**	**	*
20:1n-9	1.6	± 0.2a	1.2 ± 0.3a	2.3	± 0.2b	2.6 ± 0.2b	**	NS	NS
18:2n-6	1.6	± 0.2	1.7 ± 0.2	1.8	± 0.2	1.7 ± 0.2	NS	NS	NS
18:3n-3	1.6	± 0.2	2.0 ± 0.2	1.9	± 0.2	2.1 ± 0.2	NS	NS	NS
20:4n-6	3.0	± 0.3a	3.0 ± 0.4a	2.5	± 0.3a	4.6 ± 0.3b	NS	**	**
20:5n-3	8.6	± 0.7	8.2 ± 0.8	8.7	± 0.7	8.6 ± 0.7	NS	NS	NS
22:6n-3	7.7	± 0.7	8.3 ± 0.8	8.8	± 0.7	9.7 ± 0.7	NS	NS	NS
ΣSaturados	38.2	± 2.7a	51.1 ± 3.1b	34.4	± 2.7a	35.8 ± 2.7a	**	*	NS
ΣMUFA	37.1	± 1.9a	23.8 ± 2.2b	39.2	± 1.9a	35.1 ± 1.9a	**	**	*

ΣPUFA	24.7 ± 1.3a	25.0 ± 1.5a	26.4 ± 1.3a	29.1 ± 1.3b	*	NS	NS
ΣHUFA	20.1 ± 1.1a	20.1 ± 1.3a	21.2 ± 1.1a	23.9 ± 1.1b	*	NS	NS
n-3/n-6	3.0 ± 0.3	3.1 ± 0.3	3.0 ± 0.3	2.5 ± 0.3	NS	NS	NS

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; HUFA: ácidos grasos altamente insaturados; *Diferencias significativas ($P<0.05$); **Diferencias altamente significativas ($P<0.01$); letras diferentes indican diferencia significativa entre medias.

El 20:4n-6 aumentó significativamente (64%) en las hembras maduras alimentadas con *Ulva* en comparación con las hembras inmaduras. Los ácidos grasos saturados fueron significativamente más altos en las hembras inmaduras alimentadas con *Ulva* en comparación con las control (51.1% vs. 38.2%) sin diferencia en maduras, mientras que se encontró el efecto opuesto para MUFA en relación a *Ulva* en inmaduras (37.1% vs. 23.8).

En la fracción polar de las gónadas (Tabla 7) el consumo de *Ulva* aumentó la proporción de 18:3n-3 y 20:4n-6 50% y 17% respectivamente y disminuyó la proporción de la n-3/n-6 25%. *Ulva* tiene una proporción muy alta de 18:3n-3 (Aguilera-Morales *et al.*, 2005), cinco veces más que los otros ingredientes de la dieta suministrados a los reproductores. Los niveles altos de 18:3n-3 podrían cambiar la proporción n-3/n-6 en las gónadas y, por lo tanto, afectar la producción de eicosanoides, como la prostaglandina E₂, que desempeña un papel importante en el control de la maduración ovárica (Rowley *et al.*, 2005; Meunpol *et al.*, 2007) y, específicamente, en la proliferación de ovocitos y en el nivel de vitelogenina en la hemolinfa (Sumpownon *et al.*, 2015).

Ulva per se casi no contiene 22:6n-3, y los niveles de 20:4n-6 son mucho más altos en los otros ingredientes presentes de la dieta como poliquetos y mejillones, por lo que estos ácidos grasos probablemente no se obtuvieron directamente de *Ulva*. Sin embargo, 20:4n-6 y 22:6n-3 se pudieron obtener de los otros ingredientes, con la diferencia de que las hembras alimentadas con el alga deben presentar una mayor digestibilidad y asimilación de esos nutrientes (Peña-Rodríguez, 2010), además de un efecto protector de HUFA, gracias a la presencia de otros componentes antioxidantes presentes en *Ulva* que no están en la dieta control como: carotenoides, esteroides, polifenoles, polisacáridos sulfatados (ulvan), minerales (Zn, Se, I) y vitaminas (Cruz-Suarez *et al.*, 2009; Peña-Rodríguez *et al.*, 2011;

Cruz-Suarez *et al.*, 2013). En las membranas celulares, los antioxidantes previenen la oxidación de los lípidos, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA).

Tabla 7. Perfil de principales ácidos grasos de la fracción polar de gónadas (% del total de ácidos grasos, medias $\pm$ ES) de hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con o sin *Ulva* en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días

Estadio	Inmadura		Madura		ANOVA		
Tratamiento	Control	<i>Ulva</i>	Control	<i>Ulva</i>	E	T	ExT
16:0	23.1 $\pm$ 0.5	23.6 $\pm$ 0.6	22.1 $\pm$ 0.5	23.1 $\pm$ 0.6	NS	NS	NS
18:0	10.9 $\pm$ 0.4	10.8 $\pm$ 0.5	12.0 $\pm$ 0.4	11.4 $\pm$ 0.5	NS	NS	NS
16:1n-7	8.8 $\pm$ 0.3	8.2 $\pm$ 0.4	8.1 $\pm$ 0.3	8.2 $\pm$ 0.4	NS	NS	NS
18:1n-9	17.9 $\pm$ 0.4	17.2 $\pm$ 0.5	16.8 $\pm$ 0.4	16.3 $\pm$ 0.5	NS	NS	NS
18:1n-7	5.7 $\pm$ 0.5	6.5 $\pm$ 0.6	5.7 $\pm$ 0.5	5.3 $\pm$ 0.6	NS	NS	NS
20:1n-9	2.2 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.4	NS	NS	NS
18:2n-6	1.6 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2	NS	NS	NS
18:3n-3	1.2 $\pm$ 0.1a	1.9 $\pm$ 0.1b	1.3 $\pm$ 0.1a	1.7 $\pm$ 0.1b	NS	*	NS
20:4n-6	2.9 $\pm$ 0.2a	3.5 $\pm$ 0.3b	3.1 $\pm$ 0.2a	3.5 $\pm$ 0.3b	NS	*	NS
20:5n-3	9.4 $\pm$ 0.6	8.3 $\pm$ 0.7	9.5 $\pm$ 0.6	8.8 $\pm$ 0.7	NS	NS	NS
22:6n-3	8.0 $\pm$ 0.5ab	6.5 $\pm$ 0.5a	8.3 $\pm$ 0.5ab	9.1 $\pm$ 0.5b	**	NS	*
Σ Saturados	36.2 $\pm$ 0.7	37.3 $\pm$ 0.8	36.6 $\pm$ 0.7	37.1 $\pm$ 0.8	NS	NS	NS
Σ MUFA	38.4 $\pm$ 1.1	37.6 $\pm$ 1.2	37.2 $\pm$ 1.1	35.8 $\pm$ 1.2	NS	NS	NS
Σ PUFA	25.4 $\pm$ 1.1	25.1 $\pm$ 1.3	26.3 $\pm$ 1.1	27 $\pm$ 1.3	*	NS	NS
Σ HUFA	21.1 $\pm$ 0.9	19.5 $\pm$ 1.1	21.6 $\pm$ 0.9	21.9 $\pm$ 1.1	*	NS	NS
n-3/n-6	3.0 $\pm$ 0.2a	2.2 $\pm$ 0.2b	2.9 $\pm$ 0.2a	2.8 $\pm$ 0.2a	NS	*	NS

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; HUFA: ácidos grasos altamente insaturados; *Diferencias significativas ($P<0.05$); **Diferencias altamente significativas ($P<0.01$); letras diferentes indican diferencia significativa entre medias.

Ulva incrementó el 20:4n-6 en fosfolípidos gonadales, el cual es el sustrato para la síntesis de prostaglandinas (PG), que pueden afectar el rendimiento reproductivo, la calidad de desove y la calidad del huevo (Coman *et al.*, 2011; Kangpanich *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017). En *P. monodon*, el 20:4n-6 promueve el desarrollo embrionario y el desove (Coman *et al.*, 2011). En *L. vannamei*, mejora los tiempos de metamorfosis en nauplios y zoeas, aumenta la

resistencia de los nauplios a bajas salinidades y aumenta la tasa de fertilización (Xu *et al.*, 2017). Curiosamente, 20:4n-6 fue mayor en los lípidos de las gónadas en camarones alimentados con *Ulva*, pero disminuyó en el grupo de control. Esto podría indicar que 20:4n-6 se transfiere de los lípidos de reserva a los fosfolípidos cuando la gónada está madura, tal vez durante los pasos finales de la maduración final, que duran varias horas (Yano, 2000).

3.5. Ácidos grasos en hepatopáncreas

En las proporciones de ácidos grasos de la fracción neutra del hepatopáncreas de hembras no hubo diferencias significativas entre los ácidos grasos en relación con la etapa de maduración, tampoco fue significativa la interacción entre la etapa de maduración y el tratamiento en los lípidos neutros del hepatopáncreas (Tabla 8). Se presentaron diferencias significativas en relación con el tratamiento, siendo más bajos las proporciones de 16:1n-7, 18:1n-9 y 18:2n-6 ($P<0.05$) en las hembras que consumieron *Ulva*, mientras que la proporción del 22:6n-3 los PUFA y HUFA aumentaron (39%, 22% y 30%) en la fracción neutra de hepatopáncreas de las hembras alimentadas con *Ulva*.

Tabla 8. Perfil de principales ácidos grasos de la fracción neutra del hepatopáncreas (% del total, medias $\pm$ ES) de hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con o sin *Ulva* en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días

Estadio Tratamiento	Inmadura		Madura		ANOVA		
	Control	<i>Ulva</i>	Control	<i>Ulva</i>	E	T	ExT
16:0	19.8 $\pm$ 2.9	16.7 $\pm$ 2.8	22.4 $\pm$ 2.9a	16.5 $\pm$ 2.4	NS	NS	NS
18:0	8.1 $\pm$ 1.3	7.2 $\pm$ 1.2	7.0 $\pm$ 1.3	6.0 $\pm$ 1.3	NS	NS	NS
16:1n-9	1.9 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.3	NS	NS	NS
16:1n-7	4.8 $\pm$ 0.4b	3.8 $\pm$ 0.3a	4.9 $\pm$ 0.3b	3.5 $\pm$ 0.3a	NS	*	NS
18:1n-9	7.4 $\pm$ 0.5b	6.2 $\pm$ 0.6a	7.9 $\pm$ 0.5b	5.5 $\pm$ 0.5a	NS	*	NS
18:1n-7	5.0 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.4	4.6 $\pm$ 0.4	NS	NS	NS
20:1n-9	3.7 $\pm$ 0.3b	2.9 $\pm$ 0.3a	3.2 $\pm$ 0.3b	3.4 $\pm$ 0.3b	NS	*	NS
20:1n-7	1.5 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.5	NS	NS	NS
18:2n-6	1.7 $\pm$ 0.2a	1.8 $\pm$ 0.2a	2.0 $\pm$ 0.2b	1.5 $\pm$ 0.2a	NS	*	NS
18:3n-3	1.8 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.6	NS	NS	NS
20:4n-6	3.3 $\pm$ 0.5	3.9 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 0.5	3.7 $\pm$ 0.5	NS	NS	NS
20:5n-3	11.6 $\pm$ 1.5	13.3 $\pm$ 1.5	11.5 $\pm$ 1.5	13.2 $\pm$ 1.5	NS	NS	NS
22:6n-3	14.8 $\pm$ 1.7a	18.8 $\pm$ 1.7b	13.6 $\pm$ 1.7a	20.6 $\pm$ 1.7b	NS	**	NS
Σ Saturados	32.2 $\pm$ 2.2b	27.5 $\pm$ 2.7a	33.3 $\pm$ 2.7b	26.2 $\pm$ 2.2a	NS	**	NS
Σ MUFA	31.1 $\pm$ 1.1	28.2 $\pm$ 1.1	29.6 $\pm$ 1.1	28.5 $\pm$ 1.1	NS	NS	NS
Σ PUFA	36.8 $\pm$ 2.3a	44.4 $\pm$ 2.3b	37.1 $\pm$ 2.3a	45.3 $\pm$ 2.3b	NS	**	NS
Σ HUFA	31.2 $\pm$ 2.7a	38.2 $\pm$ 2.7b	29.7 $\pm$ 2.7a	39.8 $\pm$ 2.7b	NS	**	NS
n-3/n-6	4.2 $\pm$ 0.8	4.5 $\pm$ 0.8	4.3 $\pm$ 0.8	4.5 $\pm$ 0.8	NS	NS	NS

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; HUFA: ácidos grasos altamente insaturados; *Diferencias significativas ($P<0.05$); **Diferencias altamente significativas ($P<0.01$); letras diferentes indican diferencia significativa entre medias.

En la fracción polar de los lípidos del hepatopáncreas (Tabla 9), solo el 20:5n-3 se vio significativamente afectado por la etapa de maduración y la interacción, con niveles reducidos en hembras inmaduras alimentadas con *Ulva* (14.1%) en comparación con los otros tratamientos (15.4-15.8%).

Tabla 9. Perfil de principales ácidos grasos de la fracción polar del hepatopáncreas (% del total, medias $\pm$ ES) de hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con o sin *Ulva* en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días.

Estadio	Inmaduras		Maduras		ANOVA		
Tratamiento	Control	<i>Ulva</i>	Control	<i>Ulva</i>	E	T	ExT
16:0	17.8 $\pm$ 1.0	19.3 $\pm$ 1.0	19.6 $\pm$ 0.8	19.0 $\pm$ 1.1	NS	NS	NS
18:0	10.1 $\pm$ 0.8	11.0 $\pm$ 0.8	11.3 $\pm$ 0.7	10.3 $\pm$ 0.9	NS	NS	NS
16:1n-9	1.4 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.1	NS	NS	NS
16:1n-7	4.7 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.4	4.8 $\pm$ 0.5	NS	NS	NS
18:1n-9	9.7 $\pm$ 0.5	9.2 $\pm$ 0.5	9.1 $\pm$ 0.4	8.7 $\pm$ 0.6	NS	NS	NS
18:1n-7	4.4 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 0.4	NS	NS	NS
20:1n-9	2.3 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.3	NS	NS	NS
18:2n-6	1.4 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1	NS	NS	NS
18:3n-3	1.1 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.3	NS	NS	NS
20:4n-6	4.8 $\pm$ 0.4	4.7 $\pm$ 0.4	4.7 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 0.4	NS	NS	NS
20:5n-3	15.5 $\pm$ 0.3b	14.1 $\pm$ 0.3a	15.4 $\pm$ 0.3b	15.8 $\pm$ 0.3b	*	NS	**
22:6n-3	18.6 $\pm$ 0.8	17.4 $\pm$ 0.8	17.7 $\pm$ 0.7	18.1 $\pm$ 0.9	NS	NS	NS
Σ Saturados	30.9 $\pm$ 1.5	33.5 $\pm$ 1.5	34.0 $\pm$ 1.3	32.2 $\pm$ 1.7	NS	NS	NS
Σ MUFA	25.1 $\pm$ 1.5	23.7 $\pm$ 1.5	22.6 $\pm$ 1.3	24.2 $\pm$ 1.7	NS	NS	NS
Σ PUFA	44.0 $\pm$ 0.7	42.8 $\pm$ 0.7	43.5 $\pm$ 0.7	43.6 $\pm$ 0.9	NS	NS	NS
Σ HUFA	40.1 $\pm$ 0.7	38.1 $\pm$ 0.7	39.1 $\pm$ 0.6	39.5 $\pm$ 0.8	NS	NS	NS
n-3/n-6	4.9 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.3	4.9 $\pm$ 0.3	5.0 $\pm$ 0.4	NS	NS	NS

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; HUFA: ácidos grasos altamente insaturados; *Diferencias significativas ($P<0.05$); **Diferencias altamente significativas ($P<0.01$); letras diferentes indican diferencia significativa entre medias.

3.6. Carotenoides en gónadas, hepatopáncreas y músculo

Los carotenoides totales (Figura 4) aumentaron significativamente en gónadas (A) y en hepatopáncreas (B) de hembras maduras alimentadas con *Ulva* 34 y 700% respectivamente, sin tener efecto o interacción significativa por el tratamiento. El consumo de *Ulva* no afectó el contenido de carotenoides del músculo (C). Se reporta una correlación significativa entre

los carotenoides y el 20:4n-6 ($r = 0.62$; $P < 0.05$) con el consumo de *Ulva*, pero no con el 22:6n-3, lo que podría significar que el contenido del 20:4n-6 incrementó junto con el contenido de carotenoides, pero no el 22:6n-3.

Los carotenoides tienen propiedades antioxidantes y pueden proteger los HUFAs presentes en los ingredientes (El-Agamey *et al.*, 2004) y se ha reportado que los carotenoides en los crustáceos tienen un efecto sobre la pigmentación, como fuente de provitamina A y de protección celular contra el daño fotodinámico (El-Agamey *et al.*, 2004; Liñan-Cabello *et al.*, 2004), además participan en la activación de receptores hormonales nucleares y en la proliferación celular (Liñan-Cabello *et al.*, 2004). La astaxantina libre es el carotenoide dominante en ovarios maduros y se ha informado que mejora el desarrollo del ovario, el desove (Dall *et al.*, 1995) y la calidad del esperma en camarones (Quinitio *et al.*, 1996). Se ha documentado que los carotenoides se incorporan a las lipocarotenoproteínas en el hepatopáncreas y se transportan como vitelogenina a las gónadas, donde se acumula como vitelina en los ovocitos y se utiliza durante el desarrollo lecitotrófico. El krill también tiene una concentración de carotenoides (2.1 mg g^{-1}) y probablemente estos niveles fueron suficientes para la maduración del camarón, ya que la concentración de carotenoides en la gónada con *Ulva* fue solo ligeramente aumentada. Es posible que el exceso de carotenoides proporcionados por *Ulva* se transfiriera a los huevos y permita una mayor tasa de eclosión, ya que se producen más nauplios en hembras alimentadas con *Ulva* (Corral-Rosales *et al.*, 2018b). Los efectos benéficos sobre el desempeño reproductivo generados por el consumo de *Ulva*, *Spirulina* (Regunathan y Wesley, 2006), Paprika (Wyban *et al.*, 1997) y biofloc, (Cardona *et al.*, 2016; Emerenciano *et al.*, 2017; Braga *et al.*, 2018), probablemente se deban a su alto contenido de carotenoides.

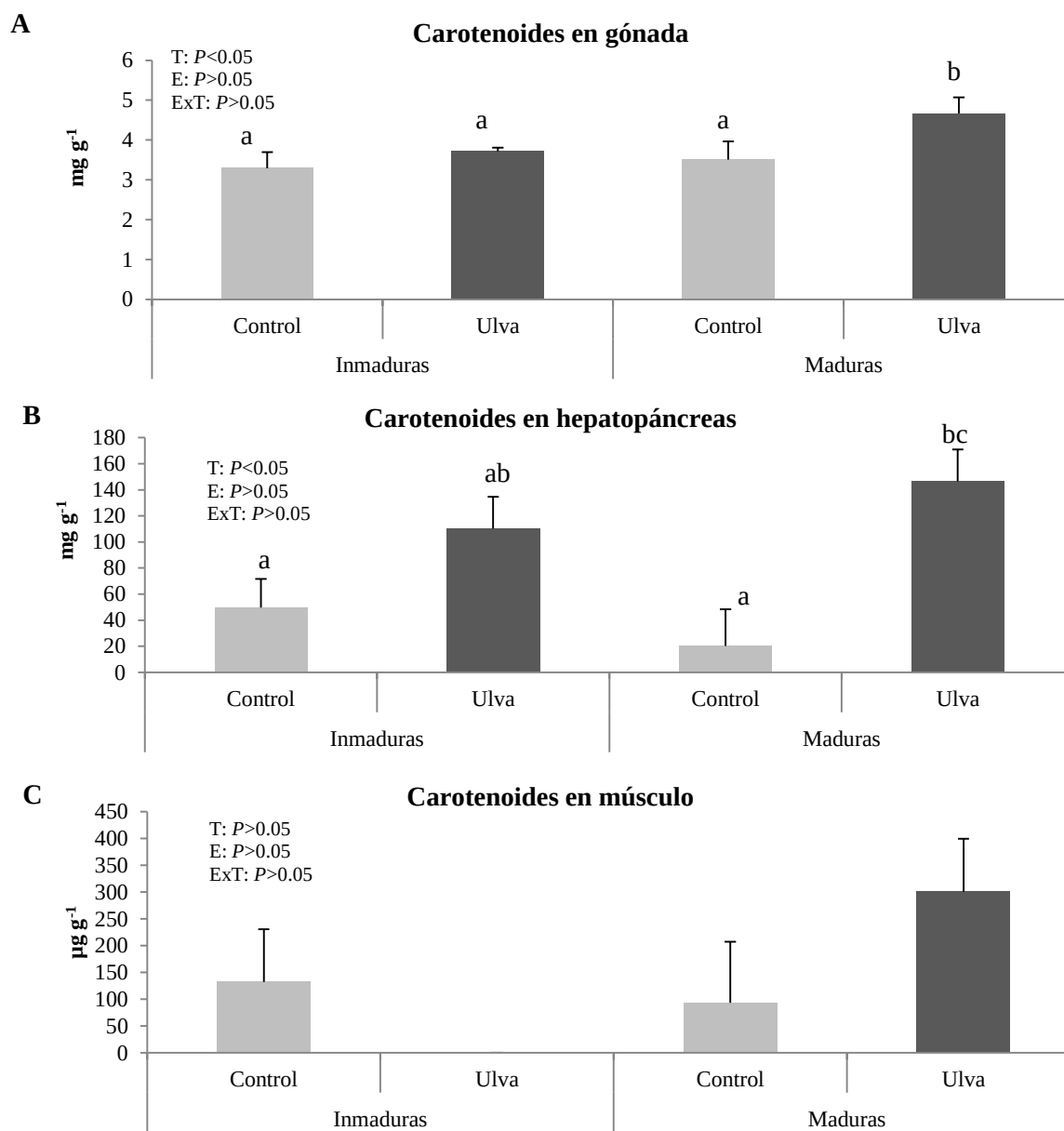


Figura 4. (A) Carotenoides medidos en gónadas (B), hepatopáncreas (C) y músculo (D) de hembras *L. vannamei* después de ser alimentadas con una dieta con o sin *Ulva* en relación con el estado de maduración, en un período experimental de 45 días (medias $\pm$ ES), considerando E=estado; T=tratamiento; ExT=interacción. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes

4. Conclusión

U. clathrata es una fuente de nutrientes funcionales con diversas propiedades biológicas y nutracéuticas que mejoran la calidad de las hembras y aumentan la capacidad reproductiva. La inclusión de *U. clathrata* al 0.8% en la dieta fresca para los reproductores *L. vannamei* promueve la sobrevivencia en hembras ablacionadas, aumenta la producción de nauplios y la tasa de eclosión y reduce el agotamiento reproductivo en hembras con desoves múltiples bajo producción comercial. Aumenta el contenido de lípidos en los ovarios y promueve el desarrollo de ovocitos tardíos vitelogénicos y postvitelogénicos, al mejorar la asimilación, el transporte y la acumulación de ácidos grasos y pigmentos (aportados por los ingredientes frescos) durante la vitelogénesis tardía y la protección de estos compuestos por el aporte de compuestos antioxidantes (pigmentos, polisacáridos sulfatados, vitaminas, polifenoles). Por lo anterior su inclusión en una dieta fresca (en este caso en la fracción calamar) es una estrategia rentable para mejorar el rendimiento reproductivo en *L. vannamei* en condiciones comerciales.

5. Referencias

- Aguilera-Morales M, Casas-Valdez M, Carrillo-Domínguez B, González-Acosta B, Pérez-Gil F. 2005. Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha spp.* as a potential food source. *Journal of Food Composition and Analysis* 18:79-88
- Álvarez M, Cahu C, Stéphan G. 1989. Teneur en alpha-tocophérol des oeufs et des organes des reproducteurs de *Penaeus indicus*. *Océanis* 15:553-560
- Arannilewa ST, Salawu SO, Sorungbe AA, Ola-Salawu BB. 2005. Effect of frozen period on the chemical, microbiological and sensory quality of frozen tilapia fish (*Sarotherodon galiaenus*). *African Journal of Biotechnology* 4:852-855.
- Avnimelech Y. 2009. *Biofloc Technology - A Practical Guide Book*. The World, Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, EUA
- Ashie NA, Smith JP, Simpson BK, Haard NF. 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 36:87-121.
- Barnes H, Blackstock J. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanilun method for 'total' lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 12:103-118.
- Bhattacharya M, Hanna MA, Mandigo RW. 1988. Effect of frozen storage conditions on yields, shear strength and color of ground beef patties. *Journal of Food Science* 53:696-700
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemical* 72:248-254
- Braga AL, Lopes DL, Poersch LH, Wasielesky Jr W. 2013. Spermatophore and sperm quality of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* fed with fresh food supplemented with pollen and paprika. *Aquaculture*, 380:29-32.
- Braga A, Lopes D, Magalhães V, Klosterhoff M, Romano L, Poersch L, Wasielesky W. 2018. Infertility of biofloc-reared *Litopenaeus vannamei* males associated with a spermatophore mycobacterial infection: Description of the pathological condition and implications for the broodstock management and larval production. *Aquaculture* 492:357-360
- Bray WA, Lawrence AL, Lester LJ. 1990. Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipid. *Journal World Aquaculture Society* 21:41-52.
- Browdy C. 1992. A review of the reproductive biology of *Penaeus* species: perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. In: Wyban, J. (Ed.), *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 22-51.

- Cahu C, Guillaume JC, Stephan G, Chim L. 1994. Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on SR and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets. *Aquaculture* 126:159–170.
- Cahu C, Cuzon G, Quazuguel P. 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids, alpha-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112:417–424
- Cardona E, Lorgeoux B, Chim L, Goguenheim J, Le Delliou H, Cahu C. 2016. Biofloc contribution to antioxidant defense status, lipid nutrition and reproductive performance of broodstock of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: Consequences for the quality of eggs and larvae. *Aquaculture* 452:252-262.
- Castille FL, Lawrence LA. 1989. Relationship between maturation and biochemical composition of gonads and digestive glands of shrimps *Penaeus aztecus* and *Penaeus setiferus* (L.). *Journal Crustacea Biology* 9:202–211.
- Cavalli RO, Scardua MP, Wasielesky JW. 1997. Reproductive performance of different sized wild and pond-reared *Penaeus paulensis* females. *Journal World Aquaculture Society* 28:260–267
- Charniaux-Cotton H. 1985. Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. *American Zoologist* 25:197-206.
- Chater PI, Wilcox MD, Pearson JP, Brownlee IA. 2015. The impact of dietary fibers on the physiological processes governing small intestinal digestive processes. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber* 6:117-132
- Chimsung N. 2014. Maturation diets for black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) broodstock: a review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 36:265–273
- Chung MY, Liu CH, Chen YN, Cheng W. 2011. Enhancing the reproductive performance of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by incorporating sodium alginate in the broodstock and larval diets. *Aquaculture* 312:180-184.
- Chung MY, Liu CH, Chen YN, Cheng W. 2011. Enhancing the reproductive performance of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by incorporating sodium alginate in the broodstock and larval diets. *Aquaculture* 312:180-184.
- Coman GJ, Arnold SJ, Barclay M, Smith DM. 2011. Effect of arachidonic acid supplementation on reproductive performance of tank-domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition* 17:141–151.
- Coman GJ, Arnold SJ, Callaghan TR, Preston NP. 2007. Effect of two maturation diet combinations on reproductive performance of domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 263:75-83
- CONAPESCA. 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, México - © - 2010 <http://www.siap.gob.mx/>

- Conchillo A, Ansorena D, Astiasarán I. 2005. Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:141-146
- Corral-Rosales DC, Palacios E, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE. 2018a. Enhancement of reproductive performance in shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) by supplementation of *Ulva clathrata* meal in maturation diet in two commercial hatcheries. *Aquaculture Research*, 49:1053-1059
- Corral-Rosales DC, Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Rodríguez-Jaramillo C, Palacios E. 2018b. Modulation of reproductive exhaustion using *Ulva clathrata* in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) broodstock during commercial maturation. *Aquaculture Research*, 49:3711-3722.
- Corral-Rosales DC, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE, Arjona O, Palacios E. 2019. Fatty acids, sterols, phenolic compounds and carotenoid changes in response to dietary inclusion of *Ulva clathrata* in shrimp *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Applied Phycology*. 1-12
- Cruz-Suárez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Ricque-Marie D. 2009a. Use of seaweeds for shrimp nutrition: status and potential. In: Browdy C. L., Darryl E. J. (eds) *The rising tide proceedings of the special session on sustainable shrimp farming*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 131–147
- Cruz-Suárez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Guajardo-Barbosa C, Ricque-Marie D. 2009b. Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. *Aquaculture Nutrition* 15:421-430.
- Cruz-Suárez LE, León A, Peña-Rodríguez A, Rodríguez-Peña G, Moll B, Ricque-Marie D. 2010. Shrimp/*Ulva* co-culture: A sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture* 301:64-68
- Cruz-Suárez *et al.* 2013. Avances en la Valoración de Macroalgas del Género *Ulva* como Nutracéutico en *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), *Contribuciones recientes en alimentación y nutrición acuícola - Memorias del Décimo Segundo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 551-595
- Dall W, Smith DM, Moore LE. 1995. Carotenoids in the tiger prawn *Penaeus esculentus* during ovarian maturation. *Marine Biology* 123:435-441
- Dall W. 1995. Carotenoids versus retinoids (Vitamin A) as essential growth factors in penaeid prawns (*Penaeus semisulcatus*). *Marine Biology* 124:209-213
- El-Gamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG, Young AJ. 2004. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of biochemistry and biophysics* 430:37-48

- Elizondo-Reyna E, Medina-González R, Nieto-López MG, Ortiz-López R, Elizondo-González R, Powell MS, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE. 2016. Consumption of *Ulva clathrata* as a dietary supplement stimulates immune and lipid metabolism genes in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Applied Phycology 28:3667-3677.
- Emerenciano M, Cuzon G, Arévalo M, Gaxiola G. 2013. Biofloc technology in intensive broodstock farming of the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*: spawning performance, biochemical composition and fatty acid profile of eggs. Aquaculture Research 45:1713-1726.
- Farouk MM, Swan JE. 1998. Effect of muscle condition before freezing and simulated chemical changes during frozen storage on the pH and colour of beef. Meat Science 50:245-256
- Focken U, Groth A, Coloso RM, Becker K. 1998. Contribution of natural food and supplemental feed to the gut content of *Penaeus monodon* Fabricius in a semi-intensive pond system in the Philippines. Aquaculture 164:105-116.
- Franks F. 1983. Metastable water at sub-zero temperatures. Cryobiology 20:335
- Gamboa-Delgado J, Peña-Rodríguez A, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE. 2011. Assessment of nutrient allocation and metabolic turnover rate in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* co-fed live macroalgae *Ulva clathrata* and inert feed: dual stable isotope analysis. Journal of Shellfish Research, 30:969-979.
- Galgani ML, Cuzon G, Galgani F, Goguenheim J. 1989. Influence du régime alimentaire sur la reproduction en captivité de *Penaeus indicus*. Aquaculture 81:337-350.
- Ghareeb DA, Abd-Elgwad A, El-Guindy N, Yacout G, Zaatout HH. 2019. *Ulva lactuca* methanolic extract improves oxidative stress-related male infertility induced in experimental animals. Archives of physiology and biochemistry, 1-9.
- Higgins FM, Kerry JP, Buckley DJ, Morrissey PA. 1998. Effect of dietary α -tocopheryl acetate supplementation on α -tocopherol distribution in raw turkey muscles and its effect on the storage stability of cooked turkey meat. Meat Science 50:373-383.
- Hoa ND, Wouters R, Wille M, Thanh V, Dong TK, Van Hao N, Sorgeloos P. 2008. A fresh-food maturation diet with an adequate HUFA composition for broodstock nutrition studies in black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798). Aquaculture 297:116-121
- Johnson AL, Tilly JL, Levorse JM. 1991. Possible role for arachidonic acid in the control of steroidogenesis in hen theca. Biology of Reproduction 44:338-44
- Kangpanich C, Pratoomyot J, Siranonthana N, Senanan W. 2016. Effects of arachidonic acid supplementation in maturation diet on female reproductive performance and larval quality of giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). PeerJ 4:e2735
- Kent M, Browdy CL, Leffler JW. 2011. Consumption and digestion of suspended microbes by juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 319:363-368.

- Kohal M N, Fereidouni A E, Firouzbakhsh F, Hayati I. 2018. Effects of dietary incorporation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* meal on growth, survival, body composition, and reproductive performance of red cherry shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Atyidae) over successive spawnings. *Journal of applied phycology*, 30:431-443.
- Kruevaisayawan H, Vanichviriyakit R, Weerachatanukul W, Magerd S, Withyachumnarnkul B, Sobhon P (2007). Biochemical characterization and physiological role of cortical rods in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 270:289-298.
- Lee FY, Chang CF. 1997. The concentrations of vitellogenin (vitellin) and protein in hemolymph, ovary and hepatopáncreas in different ovarian stages of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 117:433-439
- Leelatanawit R, Uawisetwathana U, Khudet J, Klanchui A, Phomklad S, Wongtripop S, Karoonuthaisiri N. 2014. Effects of polychaetes (*Perinereis nuntia*) on sperm performance of the domesticated black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 433:266-275.
- Li Y, Xiao G, Mangott A, Kent M, Pirozzi I. 2016. Nutrient efficacy of microalgae as aquafeed additives for the adult black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture research*, 47:3625-3635.
- Li Y, Xiao G, Mangott A, Kent M, Pirozzi I. 2016. Nutrient efficacy of microalgae as aquafeed additives for the adult black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture research*, 47:3625-3635.
- Li W, Wang K, Jiang N, Liu X, Wan M, Chang X, Liu S. 2018. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of purified polysaccharides from *Ulva pertusa*. *Journal of Applied Phycology* 1-9
- Liñan-Cabello MA, Medina-Zendejas R, Sanchez-Barajas M, Mena-Herrera A. 2004. Effects of carotenoids and retinol in oocyte maturation of crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Research* 35:905-911
- Lynn JW, Clark Jr WH 1987. Physiological and biochemical investigations of the egg jelly release in *Penaeus aztecus*. *The Biological Bulletin* 173:451-460.
- Lytle JS, Lytl TF, Ogle J. 1990. Polyunsaturated fatty acid profiles as a comparative tool in assessing maturation diets of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 89:287-299
- Méndez L, Acosta B, Racotta I. 1999. Mineral concentrations in muscle and hepatopancreas of newly caught wild and hatchery-exhausted spawners of pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Journal of Applied Aquaculture* 8:17-26.
- Meunpol O, Meejing P, Piyatiratitivorakul S. 2005. Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture Research* 36:1216-1225
- Meunpol O, Iam-Pai S, Suthikrai W, Piyatiratitivorakul S. 2007. Identification of progesterone and 17 α -hydroxyprogesterone in polychaetes (*Perinereis* sp.) and the effects of hormone extracts on penaeid oocyte development in vitro. *Aquaculture*. 270:485-492.

- Meunpol O, Dangjai E, Yoonpum R, Piyatiratitivorakul S. 2010. Detection of prostaglandin E2 in polychaetes *Perinereis* sp. and its effect on *Penaeus monodon* oocyte development in vitro. Fisheries Science. 76:281-286.
- Middleditch BS, Missler SR, Ward DG, McVey JB, Brown A, Lawrence AL. 1979. Maturation of penaeid shrimp: dietary fatty acids. Journal of the World Aquaculture Society 10:472-476.
- Millamena OM. 1989. Effect of fatty acid composition of broodstock diet on tissue fatty acid patterns and egg fertilization and hatching in pond-reared *Penaeus monodon*. Asian Fisheries Science 2:127-134.
- Moll B. 2004. Aquatic surface barriers and methods for culturing seaweed. International Patent (PCT) No. WO 2004/093525 A2.
- Naessens E, Lavens P, Gomez L, Browdy CL, McGovern-Hopkins K, Spencer AW, Kawahigashi, Sorgeloos P. 1997. Maturation performance of *Penaeus vannamei* co-fed Artemia biomass preparations. Aquaculture 155:87-101
- Norberg B, Kleppe L, Andersson E, Thorsen A, Rosenlund G, Hamre K. 2017. Effects of dietary arachidonic acid on the reproductive physiology of female Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). General and Comparative Endocrinology 250:21-35
- Okab AB, Samara EM, Abdoun KA, Rafay J, Ondruska L, Parkanyi, V, Peter M. 2013. Effects of dietary seaweed (*Ulva lactuca*) supplementation on the reproductive performance of buck and doe rabbits. Journal of applied animal research, 41:347-355.
- Olson JA. 1993. Vitamin A and carotenoids as antioxidants in a physiological context. Journal of Nutritional Science and Vitaminology 39:57-65.
- Palacios E, Carreño D, Rodríguez-Jaramillo MC, Racotta IS. 1999b. Effect of eyestalk ablation on maturation, larval performance and biochemistry of white pacific shrimp *Penaeus vannamei* broodstock. Journal of Applied Aquaculture 9:1-23.
- Palacios E, Ibarra AM, Racotta IS. 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. Aquaculture 185:353-371.
- Palacios E, Ibarra AM, Ramirez JL, Portillo G, Racotta I. S., 1998. Biochemical composition of eggs and nauplii in white pacific shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. Aquaculture Research 29:183-189
- Palacios E, Perez-Rostro CI, Ramírez JL, Ibarra AM, Racotta IS. 1999c. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. Aquaculture 171:309-321
- Palacios E, Racotta IS, Heras H, Marty Y, Moal J, Samain JF. 2001. The relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white pacific shrimp (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931). Aquaculture International 96:531-543

- Palacios E, Racotta IS, Villalejo M. 2003. Assessment of ovarian development and its relation to mating in wild and pond-reared *Litopenaeus vannamei* shrimp in a commercial hatchery. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34:466-477
- Pangantihon-Kuhlmann M, Millamena O, Chern Y. 1998. Effect of dietary astaxanthin and vitamin A on the reproductive performance of *Penaeus monodon* broodstock. *Aquatic Living Resources* 11:403-409.
- Paibulkichakul C, Piyatiratitivorakul S, Sorgeloos P, Menasveta P. 2008. Improved maturation of pond-reared, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using fish oil and astaxanthin feed supplements. *Aquaculture* 282:83-89
- Pangestuti R, Kurnianto D. 2017. Green seaweeds-derived polysaccharides Ulvan: occurrence, medicinal value and potential applications. In *Seaweed Polysaccharides* (pp. 205-221).
- Peña-Rodríguez A, Mawhinney TP, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE. 2011. Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. *Food Chemistry* 129:491-498.
- Pongtippatee-Taweepreda P, Chavadej J, Plodpai P, Pratoomchart B, Sobhon P, Weerachatanukul W, Withyachumnarnkul B. 2004. Egg activation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 234:183-198.
- Prato E, Fanelli G, Angioni A, Biandolino F, Parlapiano I, Papa, L, Ferranti MP. 2018. Influence of a prepared diet and a macroalga (*Ulva sp.*) on the growth, nutritional and sensory qualities of gonads of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 493:240-250.
- Quinitio ET, Parado-Esteva FD, Millamena OM, Biona H. 1996. Reproductive performance of captive *Penaeus monodon* fed various sources of carotenoids, pp. 74-82. In: Santiago CB, Coloso RM, Millamena OM, Borlongan IG (eds) *Feeds for Small-Scale Aquaculture*. Proceedings of the National Seminar-Workshop on Fish Nutrition and Feeds: SEAFDEC Aquaculture Department, Iloilo, Philippines
- Regunathan C, Wesley SG. 2006. Pigment deficiency correction in shrimp broodstock using *Spirulina* as a carotenoid source. *Aquaculture Nutrition* 12:425-563.
- Regunathan C, Wesley SG. 2006. Pigment deficiency correction in shrimp broodstock using *Spirulina* as a carotenoid source. *Aquaculture Nutrition* 12:425-563.
- Rowley AF, Vogan CL, Taylor GW, Clare AS. 2005. Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *Journal of Experimental Biology* 208:3-14
- Schiener P, Black KD, Stanley MS, Green DH. 2015. The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. *Journal of Applied Phycology* 27:363-373.
- Slavin J. 2013. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients* 5:1417-1435
- Suganthi N, Karutha Pandian S, Pandima Devi K. 2009. Neuroprotective effect of seaweeds inhabiting South Indian coastal area (Hare Island, Gulf of Mannar Marine Biosphere Reserve): cholinesterase inhibitory effect of *Hypnea valentiae* and *Ulva reticulata*. *Neuroscience Letters* 68:216-219

- Sumpownon C, Engsusophon A, Siangcham T, Sugiyama E, Soonklang N, Meeratana P, Sobhon P. 2015. Variation of prostaglandin E2 concentrations in ovaries and its effects on ovarian maturation and oocyte proliferation in the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. General and Comparative Endocrinology 23:129–138.
- Sun Y, Chen X, Song L, Liu S, Yu H, Wang X, Li P. 2018. Antiviral activity against *Avian Leucosis virus* subgroup J of degraded polysaccharides from *Ulva pertusa*. BioMed Research International 6:57-63
- Tan-Fermin JD, Pudadera RA. 1989. Ovarian maturation stages of the wild giant tiger prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). Aquaculture 77:229–242
- Trigui M, Gasmi L, Zouari I, Tounsi S. 2013. Seasonal variation in phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of *Ulva rigida* (Chlorophyta) and assessment of antiacetylcholinesterase potential. Journal Applied Phycology 25:319-328.
- Tsukimura B. 2001. Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. American Zoologist 41:465-476.
- Usman U, Kamaruddin K, Laining A, Trismawanti I. 2019. Fatty Acid Profile of Hepatopancreas and Oocyte of Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*, Fed Modified-commercial Diet by Supplementing Vitamin C and E. Aquacultura Indonesiana, 20:15-23.
- Vaca A, Alfaro J. 2000. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. Aquaculture 182:373-385.
- Van Handel E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. Analytical. Biochemistry 11:256–265.
- Varadharajan D, Pushparajan N. 2013. Food and feeding habits of aquaculture candidate a potential Crustacean of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, South East Coast of India. Journal of Aquaculture Research and Development 4-1
- Vargas-Cardenas J, Olivera-Galvez A, Brito LO, Vega-Galarza E, Cano-Pitta D, Vergara-Rubin V. 2015. Assessment of different levels of green and brown seaweed meal in experimental diets for whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone) in recirculating aquaculture system. Aquaculture International 23:1491-1504.
- Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal Plant Physiology 144:307-313.
- Wouters R, Lavens P, Nieto J, Sorgeloos P. 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. Aquaculture 202:1-21.
- Wouters R, Nieto J, Sorgeloos P. 2000. Artificial diets for penaeids shrimp. Global Aquaculture Advocate 3:61-62
- Wouters R, Zambrano B, Espin M, Calderon J, Lavens P, Sorgeloos P. 2002. Experimental broodstock diets as partial fresh food substitutes in white shrimp *Litopenaeus vannamei* B. Aquaculture Nutrition 8:249-256

- Wu X, Cheng Y, Sui L, Zeng C, Southgate PC, Yang X. 2007. Effect of dietary supplement of phospholipids and highly unsaturated fatty acids on reproductive performance and offspring quality of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne- Edwards), female broodstock. *Aquaculture* 273:602–613
- Wyban J, Martinez G, Sweeney J. 1997. Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diet improves nauplii quality. *World Aquaculture* 28:59-62.
- Xu H, Zhang Y, Luo K, Meng X, Luan S, Cao B, Kong J. 2017. Arachidonic acid in diets for early maturation stages enhances the final reproductive performances of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 479:556–563.
- Xu XL, Ji WJ, Castell JD, O'Dor RK. 1994. Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. *Aquaculture* 119:359-370.
- Yaich H, Garna H, Besbes S, Paquot M, Blecker C, Attia H. 2011. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chemistry* 128:895-901
- Yaich H, Amira AB, Abbes F, Bouaziz M, Besbes S, Richel A, Garna H. 2017. Effect of extraction procedures on structural, thermal and antioxidant properties of ulvan from *Ulva lactuca* collected in Monastir coast. *International Journal of Biological Macromolecules* 105:1430-1439.
- Yano I, Chinzei Y. 1987. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry Physiology* 86B:213–218.

Efecto de la Vitamina C en los Camarones Peneidos: Estado Actual del Conocimiento

Tsai García-Galano^{1*}, Olimpia Carrillo², Laida Ramos¹ y Gabriela Gaxiola³

¹Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Cuba *tsai@cim.uh.cu

²Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

³UMDI, SISAL, Facultad de Ciencias, UNAM, México

Resumen

El desarrollo acelerado de la camaronicultura ha traído aparejado el empleo de modernas tecnologías, pero también ha hecho necesario el estudio de las necesidades nutricionales de las diferentes especies de camarones para optimizar su cultivo. En sus inicios, las investigaciones se enfocaron hacia los macronutrientes y en particular las proteínas, no obstante, necesariamente debió ampliarse a los micronutrientes y a conocer la función de las vitaminas por el papel que desempeñan en el metabolismo y la fisiología del animal. La vitamina C es un nutriente esencial para los camarones peneidos. En comparación con la disponible para los animales terrestres y de los peces, existe poca información sobre este nutriente. En el presente trabajo, se hace una revisión de la mayoría de los resultados obtenidos por diferentes autores en aspectos como el crecimiento, la maduración, la inmunoestimulación y el estrés, así como también se analiza la interacción entre las vitaminas C y E, que permitirán tener una visión general y una mayor comprensión sobre la importancia de esta vitamina en la alimentación de los camarones peneidos.

Palabras claves: camarones peneidos, vitamina C, requerimiento, interrelación C y E,

Introducción

La acuicultura es uno de los sectores con más rápido crecimiento a nivel mundial y constituye una actividad muy importante para muchos países al ser fuente de empleo y alimento para la población. Según la FAO (2016), en el año 2014 se produjeron por este concepto 6.9 millones de toneladas de crustáceos, 49 millones de toneladas de peces de escama y 16.1 millones de toneladas de moluscos. El incremento sostenido de la producción (FAO, 2018), trae necesariamente la necesidad de optimizar el proceso productivo y uno de los principales retos es disminuir los costos del alimento, que representan uno de los mayores gastos en el cultivo. A mediados del siglo pasado, cuando los métodos del cultivo de peces se fueron perfeccionando, es que comienza el despegue de las investigaciones científicas en este campo de la nutrición piscícola (Jobling, 2016) y con el inicio de la camaronicultura, se hace necesario desarrollar esfuerzos para lograr la expansión de la acuicultura y el desarrollo del cultivo intensivo.

El cultivo moderno de los camarones peneidos comienza en 1930 cuando Motosaku Hudinaga logra cerrar el ciclo de vida de *Marsupenaeus japonicus*, se alcanza su producción masiva y se lleva a escala comercial. En América, Ecuador en los años 60 y los Estados Unidos a fines de los 60 e inicios del 70 del pasado siglo, fueron los pioneros, y basaron su industria en *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris* (Hudinaga, 1935; Treece, 2000).

Aunque en sus inicios las investigaciones estuvieron encaminadas a estudiar los requerimientos de los macronutrientes, particularmente las proteínas, estos estudios se amplían hacia el papel desempeñado por las vitaminas.

El concepto de vitamina apareció a finales del siglo XIX y el término “vitamina” le fue dado en 1910 por Funk, quien la describió como “la amina necesaria para la vida”. Según Guillaume *et al.* (2001), numerosos interrogantes existen sobre la nutrición de estos nutrientes como ¿cuáles son los síntomas de sus deficiencias? ¿cuáles son los requerimientos cuantitativos? Estas preguntas siguen teniendo total vigencia después de haberlas formulado hace casi 20 años, aunque diversas investigaciones se han realizado en ese período que han permitido una visión más amplia sobre su importancia en el crecimiento, reproducción, y estado de salud, entre otras.

Las vitaminas, aunque se requieren en cantidades muy pequeñas, son de gran importancia biológica al ser esenciales en la función de la mayor parte de las formas de vida animal y al no poder ser sintetizadas por algunos organismos, deben ser adquiridas por tanto de fuentes exógenas (Nelson y Cox, 2018).

El ácido ascórbico (AA) o vitamina C es un nutriente esencial para los camarones peneidos (He y Lawrence, 1993), actúa como un poderoso agente reductor en las células y tejidos del cuerpo, como cofactor en las reacciones de hidroxilación de prolina a hidroxiprolina y es un regulador de la síntesis de esteroides (Hunter *et al.*, 1979; Conklin, 1997; Groff y Cropper, 1999; Hayat, 2013). En la mayoría de los animales acuáticos, incluyendo a los crustáceos, el AA debe ser suministrado a través de la dieta al no poseer la enzima L-gulonolactona oxidasa, la cual se requiere para la biosíntesis del ascorbato a partir de la glucosa como precursor (Chatterjee, 1973; Dabrowski, 1990; Ai *et al.*, 2006).

Las vitaminas en su función ejercen efectos sinérgicos y en algunos casos antagónicos entre ellas, en las vías metabólicas en las que participan. En el caso de la vitamina C está bien reconocida su relación con la vitamina E (α -tocoferol), fundamentalmente en la función antioxidante que ambas ejercen. La vitamina C participa en la regeneración o reciclaje de la vitamina E después de formarse el radical tocoferilo (Traber, 2014). En este proceso participa la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), es decir otra vitamina, en este caso la nicotinamida.

Aun cuando se han demostrado esos efectos combinados en otras especies y se han estudiado los requerimientos de ambas vitaminas en diferentes estadios de camarones peneidos, son pocos los trabajos dirigidos a estudiar los efectos combinados de ambas en camarones y si estos efectos pueden ir más allá de la relación antioxidante (Molina *et al.*, 2002; Wouters *et al.*, 2001ab; Nguyen *et al.*, 2011). En el presente trabajo, se hace una revisión del estado actual del conocimiento de los efectos de la vitamina C o ácido ascórbico (AA) en el crecimiento, la maduración y calidad larval, la respuesta al estrés y la inmunoestimulación, así como de su interacción con la vitamina E, y se refleja la importancia de continuar las investigaciones en este campo.

Vitamina C y sus principales funciones

Crecimiento

La búsqueda de altos rendimientos productivos casi siempre ha venido unida a lograr la obtención de elevados crecimientos, constituyendo el estudio de los requerimientos nutricionales de una especie dada, un foco de atención para científicos y acuicultores.

La incorporación de la vitamina C en la dieta de los camarones es esencial y diversos autores han demostrado que su inclusión incrementa el peso y la eficiencia de la alimentación (Deshimaru y Kuroki, 1976; Catacutan y Lavilla-Pitogo, 1994; Chen y Chang, 1994; Hsu y Shiau, 1997; Moe *et al.*, 2005, Niu *et al.*, 2009) (Tabla 1). Una dieta deficiente en AA, causa además de una disminución en el crecimiento, una reducción en la frecuencia de las mudas o mudas incompletas (He y Lawrence, 1993; Xu *et al.*, 1994). Este comportamiento puede estar asociado a las variadas funciones de la vitamina C, como su papel como agente reductor, actuar como cofactor en muchas reacciones bioquímicas, en la formación del exoesqueleto de los crustáceos en el ciclo de la muda, o su papel en ciertos aspectos el metabolismo de las proteínas (Chatterjee, 1967; Lovell, 2001; Fenucci *et al.*, 2004).

No obstante, el empleo de diferentes derivados de la vitamina C no producen los mismos resultados. Lee y Shiau (2002), encontraron variaciones en el requerimiento de AA de *Penaeus monodon* al emplear distintos derivados, sin embargo, Ribeiro-Ferrez *et al.* (2012), no señalan diferencias en el crecimiento de *Litopenaeus vannamei* cuando se comparan varias fuentes de AA. Este último comportamiento también fue observado por Moreau *et al.* (1998) en *P. monodon* al emplear AA recubierto de silicona y L-ascorbil-2-polifosfato.

Variados niveles de incorporación en la dieta, la inclusión de diferentes derivados del AA en la formulación, distintas especies estudiadas, así como otros factores tales como la edad y variables experimentales, entre otros, pueden ser la causa de las variaciones encontradas en los requerimientos para lograr los máximos crecimientos. Los animales algunas veces manifiestan un requerimiento de nutriente para maximizar la concentración en el cuerpo, la cual es más alta que la que necesita para maximizar el crecimiento (Shiau, 2001).

Tabla 1. Requerimientos de vitamina C en camarones peneidos

Especie	Fuente Vit. C	Requerimiento (mg kg ⁻¹ dieta)	Efectos observados	Parámetros evaluados	Referencia
<i>Penaeus monodon</i>	C2PP	209	Más elevadas GP, EA y S%	Concentración hemolinfa, HP y músculo	Chen y Chang (1994)
<i>Penaeus monodon</i>	C2MP-Mg	100, 200	Más elevadas GP, FCA, TCE, S%	Histología HP	Catacutan y Lavilla-Pitogo (1994)
<i>Penaeus monodon</i>	C2PP	Postlarva 3400	< mortalidad después shock osmótico	Reto a colonias de Vibrio AA en las Pl	Merchie <i>et al.</i> (1998)
<i>Penaeus monodon</i>	C2PP	Poslarva 200	Mejora condiciones fisiológicas	Shock salino	Merchie <i>et al.</i> (1997a)
<i>Penaeus monodon</i>	C2PP	Postlarva 2000	Incrementa resistencia estrés e infecciones bacterianas	Infección con Vibrio	Merchie <i>et al.</i> (1997b)
<i>Penaeus monodon</i>	AA C2S C2PP C2MP-Na 2MP-Mg	2000,10000 157, 785 210, 1050 106, 530 40, 200	> GP y EA >THC > PO actividad > GP y EA > THC > PO actividad	THC, PO THC, PO THC, PO THC, PO THC, PO	Lee y Shiau (2002)
<i>Penaeus monodon</i>	C2PP C2S	29.27 73.83	> GP >GP	FCA, concentración AA en el HP	Hsu y Shiau (1997)

<i>Penaeus monodon</i>	AA recubierto silicona C2PP	500 500	=crecimiento S%	Crecimiento, S%, concentración ascorbato HP y hemolinfa	Moreau <i>et al.</i> (1998)
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	AA	3000	No se observan síntomas de deficiencias	GP, EA	Deshimaru y Kuroki (1976)

Tabla 1 (cont.). Requerimientos de vitamina C en camarones peneidos

Especie	Fuente Vit. C	Requerimiento (mg kg ⁻¹ dieta)	Efectos observados	Parámetros evaluados	Referencia
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	AA	50	Incrementa resistencia infecciones bacterianas	Infección con Vibrio	Kanazawa (1996)
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	C2MP-Mg	215, 430	Previene signos clínicos de deficiencias	S%, lesiones negras tejido subcutáneo	Shigueno e Itoh (1988)
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	C2MP-Mg	Reproductores H con ablación unilateral pedúnculo ocular 500, 1000 500	H >IGS M buen crecimiento y S%	Concentración AA tejido y hemolinfa IGS, IHS	Alava <i>et al.</i> (1993)
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	C2MP-Mg C2MP-Na/Ca	Larvas 165 122	Normal crecimiento	S%, peso, estrés con baños de formalina	Moe <i>et al.</i> (2004)
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	C2MP-Na/Ca	Postlarva 91.8 de AA >800	>crecimiento Resistencia al estrés osmótico y por formalina	GP, TCE, tolerancia al estrés osmótico y por formalina	Moe <i>et al.</i> (2005)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	AA C2S	100, 200, 400 50, 100, 200	Mejora S% en relación a un control negativo Mejora significativamente la S% con	S% S%	Conklin y Baum (1995)

García-Galano, T., Carrillo, O., Ramos, L. y Gaxiola, G. 2019. Efecto de la Vitamina C en los Camarones Peneidos: Estado Actual del Conocimiento. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 106-131.

			respecto a dieta con AA		
<i>Litopenaeus vannamei</i>	C2PP	90, 120	Normal contenido de AA en el cuerpo	Almacenamiento o AA en el cuerpo	He y Lawrence (1993)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	C2PP	1500	> S%	Resistencia a Vibrio	Kontara <i>et al.</i> (1997)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	C2MP	Postlarva 130 10, 2000	GP No diferencias	Biomasa Shock salino	Lavens <i>et al.</i> (1999)

Tabla 1 (cont.). Requerimientos de vitamina C en camarones peneidos

Especie	Fuente Vit. C	Requerimiento (mg kg ⁻¹ dieta)	Efectos observados	Parámetros evaluados	Referencia
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Stay C-35	Reproductores 800	> promedio desoves/h > tasa de eclosión > tasa fertilización	Concentración AA en Hp, ovario y huevos	Du <i>et al.</i> (2004)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	C2PP	191 360, 436	GP > resistencia bajos niveles oxígeno	TCE Oxígeno disuelto	Niu <i>et al.</i> (2009)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	C2MP-Mg	100	>S% Previene síntomas clínicos de deficiencias	Histología tejidos, frecuencia mudas, FCA	Montoya y Molina (1995)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	AA cristal AA revestido AA monofosfato AA PEG (polietileno-glicol)	180, 260	No hubo diferencias entre las fuentes y niveles	Crecimiento, S%, retención proteica y salud camarones	Ribeiro Ferrez <i>et al.</i> (2012)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	C2PP	14, 48, 84, 305 y 639 de AA 308 de AA	= crecimiento Incrementa S% después estrés salino	GP, hematológicos, actividad antioxidante, cambios salinos	Chen <i>et al.</i> (2017)
Camarones peneidos	Estable y biodisponible	Cria larval Nursery 20-130	Crecimiento y S% normal		Merchie <i>et al.</i> (1997)

García-Galano, T., Carrillo, O., Ramos, L. y Gaxiola, G. 2019. Efecto de la Vitamina C en los Camarones Peneidos: Estado Actual del Conocimiento. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisiones en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 106-131.

		1500	Incrementa resistencia al stress y las enfermedades		
--	--	------	--	--	--

AA: ácido ascórbico; AA: monofosfato (2-monofosfato calcio sal de L-ácido ascórbico); Ácido ascórbico PEG: (polietilen glicol); C2MP-Mg: (L-ascorbil-2-monofosfato-Mg); C2MP-Na: (L-ascorbil-2-monofosfato-Na); C2PP: (L-ascorbil-2-polifosfato); C2S: (L-ascorbil-2-sulfato); EA: eficiencia de la alimentación; FCA: factor conversión alimento; GP: ganancia en peso; H: hembra; HP: hepatopáncreas; IGS: índice gonado-somático; M: macho; PO: actividad fenoloxidasa; S%: sobrevivencia; Stay C-35: derivado estable, mayormente monofosfato; TCA: tasa de crecimiento específica; THC: conteo total hemocitos

Maduración. Huevo y Larvas

En el cultivo del camarón, lograr una exitosa maduración gonadal, huevos de calidad y una alta sobrevivencia larval, es uno de los principales objetivos del productor.

Entre los métodos mundialmente establecidos para alcanzarlos está la manipulación hormonal, principalmente la ablación unilateral de los pedúnculos oculares de los camarones, con el fin de reducir los niveles circulantes de la hormona inhibidora de las gónadas. Sin embargo, en la actualidad se llevan a cabo estudios destinados a la utilización de métodos alternativos a la ablación ocular, menos agresivos y que logren resultados productivos similares (Ramos *et al.*, 2019). La manipulación nutricional es otro aspecto muy importante a tener en cuenta, que influye principalmente en la calidad y cantidad de huevos desovados, así como en la calidad y sobrevivencia de las larvas (Bray y Lawrence, 1992). Una nutrición adecuada es un factor fundamental en esta etapa, sin embargo, es limitado el conocimiento con respecto a otras fases de vida, siendo generalmente los requerimientos dietéticos más elevados en la maduración sexual que en la etapa no reproductiva de los adultos o en la fase juvenil (Harrison, 1990; Wouters *et al.*, 2001, Dawood y Koshio, 2018).

Las investigaciones sobre los efectos de la vitamina C han estado encaminadas principalmente hacia la etapa juvenil, pero hay evidencias de que los requerimientos de los animales poiquiloterms parecen estar relacionados directamente con su tasa metabólica y varían con el crecimiento (Matusiewicz *et al.*, 1994; Gabaudan y Verlhac, 2001).

La importancia de incluir la vitamina C en la alimentación de reproductores de *Marsupenaeus japonicus* ya había sido mencionado por Alava *et al.* (1993), quienes reportaron que una dieta deficiente en AA retardaba la maduración gonadal. Cahu *et al.* (1995), evaluando el efecto de los ácidos grasos poliinsaturados, la vitamina E y la C en la dieta de los reproductores de *Fenneropenaeus indicus*, señalan que estos nutrientes son indispensables para alcanzar embriones y larvas de calidad, siendo necesario administrarlos en concentraciones adecuadas. Ellos relacionaron las altas tasas de eclosión con altos niveles de AA en los huevos. Wouters *et al.* (2001) también plantean la importancia de estos 3 nutrientes e indican particularmente la de la vitamina C en el desarrollo del huevo y la eclosión de *L. vannamei*.

Cahu (2000) sugiere que, para asegurar el éxito de la reproducción, la concentración de AA en la dieta debe ser superior a 450 mg kg⁻¹.

Du *et al.* (2004), investigando el comportamiento reproductivo en *L. vannamei* reportan que el promedio diario de desoves por hembra, la tasa de fertilización y la tasa de eclosión se vieron afectadas significativamente por los niveles dietéticos del AA, demostrando la necesidad de suplementarlo en la dieta para obtener buenos resultados en la maduración ovárica y el desarrollo reproductivo.

Escasos son los trabajos que evalúan la influencia de las vitaminas en la calidad del espermatóforo y el esperma de los machos en cautiverio. Alfaro-Montoya (2010) en una revisión de las condiciones reproductivas de los machos de camarones del género *Penaeus*, indica la poca atención que ha recibido el estudio de sus requerimientos nutricionales cuando se compara con las hembras, aunque ya se ha indicado la importancia de las vitaminas C y E en el mantenimiento de la calidad espermática de *Litopenaeus setiferus* (Leung-Trujillo y Lawrence, 1988; Chamberlain, 1988) y se ha señalado que las dietas comúnmente ofrecidas a los reproductores de las unidades de maduración de *L.vannamei* resultan en un deficiente suministro de vitaminas y minerales que afecta la calidad espermática (Pérez-Velázquez *et al.*, 2003).

Inmunoestimulación. Respuesta al estrés

Con el desarrollo explosivo de la industria camaronera y el empleo de nuevas técnicas para incrementar la producción, se hace necesario mantener la salud de los organismos. Diferentes tecnologías se han implementado y variadas prácticas de alimentación son utilizadas donde se emplean diferentes componentes en la formulación de la dieta, tales como los inmunoestimulantes, los cuales activan el sistema inmune de los animales.

Los camarones poseen un sistema de defensa innato o no específico con componentes celulares y humorales, empleando la aglutinación de la hemolinfa, los factores hemolíticos, las lectinas, el sistema profenol-oxidasa (proPO) y las especies reactivas del oxígeno para inhibir y eliminar cualquier microorganismo extraño que represente un peligro para el hospedero (Zang *et al.*, 2009; Xian *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2016).

Diferentes inmunoestimulantes son empleados en la acuicultura, entre ellos los polisacáridos, oligosacáridos, nutrientes, péptidos antimicrobianos, hierbas y microorganismos.

Diversos autores han indicado el papel de la vitamina C como inmunoestimulante (Lee y Shiau, 2002a; Quiao *et al.*, 2011) lo cual pudiera estar relacionado con su acción como antioxidante.

Lee y Shiau (2002) demostraron que la vitamina C es un inmunoestimulante para *P. monodon* al comprobar que dietas conteniendo ascorbato producían respuestas inmunes más elevadas (conteo de hemocitos totales, actividad fenol-oxidasa) que en camarones deprimidos de AA. Una combinación de beta 1.3/1.6 glucano y vitamina C produjeron el mejor efecto aditivo en inducir la respuesta inmune no específica en *L. vannamei* (Wu *et al.*, 2016)

El incremento de la vitamina C en el alimento mejora la respuesta de los hemocitos al estallido respiratorio y el crecimiento, previniendo la acumulación de cobre (Cu) en los tejidos de *P. monodon* mantenidos con altos niveles dietéticos de Cu (Lee y Shiau, 2003).

Lightner *et al.* (1979) indicaron que la enfermedad conocida como “muerte negra”, donde se observan manchas negras bajo la cutícula, es producida cuando los camarones sometidos a cultivo son alimentados con dietas deficientes en AA. Quiao *et al.* (2011) encontraron que la vitamina C mejora la actividad inmune y la capacidad de resistencia a la vibriosis, aumentando significativamente la actividad fenoloxidasa, super oxido dimutasa, peroxidasa y antibacteriana en *L. vannamei*. El incremento de la resistencia a infecciones bacterianas en camarones alimentados con dietas suplementadas con AA también ha sido señalado por Shigueno e Itoh (1988), Kanazawa (1996) en *M. japonicus*, por Merchie *et al.* (1997) en postlarvas de *P. monodon* y Montoya y Molina (1995) y Kontara *et al.* (1997) en *L. vannamei*. Diferentes factores ambientales como los contaminantes o parámetros físico-químicos pueden afectar la respuesta inmune de los crustáceos al provocar condiciones de estrés (Le Moullac y Haffner, 2000). La capacidad antioxidante y la tolerancia al estrés salino fueron estudiadas por Chen *et al.* (2017) y encontraron que las actividades de las enzimas glutatión-reductasa y la glutatión peroxidasa se vieron significativamente afectadas por los niveles dietéticos de la vitamina C. Cambios agudos en la salinidad pueden causar estrés en los camarones y generar una producción masiva de radicales libres que pueden hacerlos susceptibles a contraer enfermedades.

Moe *et al.* (2004) encontraron un normal crecimiento en larvas de *M.japonicus* sometidas a estrés con baños de formalina, mientras que *L.vannamei* tiene una mayor resistencia a bajos niveles de oxígeno disuelto con concentraciones de L-acorbil-2-polifosfato de 360, 436 mg kg⁻¹ de dieta (Niu *et al.*, 2009).

García-Galano *et al.* (2007) al evaluar el efecto del lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* y del amonio disuelto en las concentraciones de AA en el músculo y el hepatopáncreas de *Litopenaeus schmitti*, señalaron un incremento en la demanda de AA en los tejidos analizados y sugieren que esto resultaría en un mayor requerimiento de vitamina C para responder al estrés causado por el LPS y el amonio, respectivamente.

Interacción entre las vitaminas C y E

La vitamina E es un nutriente esencial para los camarones, como para la mayoría de las especies animales. Pertenece al grupo de vitaminas liposolubles, con ocho vitámeros naturales: los α , β , δ y γ -tocoferol y α , β , δ y γ tocotrienoles, se sintetiza solamente por las plantas. Esta vitamina posee actividad antioxidante y en diferentes especies animales se ha encontrado que regula la expresión de genes relacionados con una amplia gama de funciones celulares y efectos en el sistema inmune pero no se ha profundizado en este aspecto en camarones. El vitámero con mayor actividad biológica es el α -tocoferol.

Aunque el papel principal que se le ha atribuido a esta vitamina es su capacidad antioxidante, la misma desarrolla otras funciones no siempre asociadas al efecto antioxidante.

Las fuentes naturales de la vitamina E son los aceites vegetales; las semillas de girasol contienen casi exclusivamente α -tocoferol, el aceite de soya es rico en α , δ y γ tocoferoles y el de palma contiene tocotrienoles y α -tocoferol.

La vitamina E es un potente secuestrador de radicales libres y protege especialmente a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) de la oxidación. El radical tocoferilo producido en este proceso reacciona con la vitamina C y de esta manera la vitamina E retorna a su estado original mientras la vitamina C se oxida. La regeneración de la vitamina E es un mecanismo fisiológico relevante (Traber 2014) (Fig. 1).

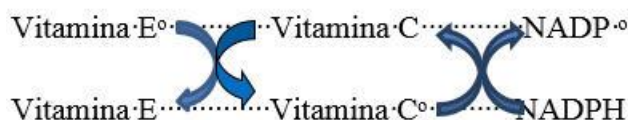


Figura 1. Regeneración de la vitamina E por acción de la vitamina C y el NADP.

Aun cuando se ha demostrado de forma fehaciente la relación entre la vitamina C y la E, existen pocos resultados sobre el efecto combinado de estas vitaminas *in vivo* en camarones peneidos. (Tabla 2).

Los experimentos realizados por Cahu, Cuzon y Quazugel en 1995 con el objetivo de estudiar el efecto de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés), α -tocoferol y ácido ascórbico en dietas para reproductoras sobre la calidad de los huevos, el desarrollo embrionario y el desove, mostraron que la concentración dietética de HUFA, α -tocoferol y ácido ascórbico afectaron significativamente la concentración de estos nutrientes en los huevos. Los autores analizan lo encontrado por otros investigadores en cuanto a las relaciones entre el nivel de HUFA y α -tocoferol y en cuanto al papel antioxidante del ácido ascórbico y el α -tocoferol que protege a las membranas de la oxidación y degradación por radicales libres. Molina *et al.* (2002) estudiaron el efecto combinado de estas dos vitaminas sobre la salud de *L. vannamei* estimulados con β -glucanos y desafiados contra el Virus de la Mancha Blanca. Los investigadores utilizaron 15 dietas con diferentes cantidades de vitaminas C (50, 150 y 450 mg kg⁻¹) y E (50, 100, 250, 500 y 1000 mg kg⁻¹). Las dietas fueron suministradas por 21 días y 12 días más con 75 ppm de β -glucanos. Para las pruebas de desafío se utilizaron los animales con mejor respuesta inmunitaria. Los animales que presentaron la menor tasa de mortalidad por el Virus de la Mancha Blanca y mejor respuesta inmune fueron los de las dietas que contenían 150 mg de vitamina E con 500 de vitamina C por kg de dieta y 50 mg vitamina E con 50 mg vitamina C con 75 de β -glucanos. Del trabajo anterior puede deducirse que es muy importante la cantidad relativa de vitamina C/vitamina E y deducen que a bajos niveles de vitamina E se hace necesario aumentar la cantidad de vitamina C con respecto a

la actividad de superóxido dismutasa, mientras que con los valores más altos de vitamina E se incrementó la actividad fenol oxidasa a las más bajas concentraciones de vitamina C. Aunque se evidencia en este trabajo que existe una relación funcional entre ambas vitaminas resulta difícil obtener conclusiones generalizadoras.

Nguyen *et al.* (2011) investigaron las interacciones de las vitaminas C y E en el comportamiento reproductivo y la calidad de las larvas en *M. japonicus*. En esta investigación midieron las concentraciones de las vitaminas en hepatopáncreas, ovarios, músculos y huevos, como otra forma de evaluar sus efectos. Los autores consideraron que este fue el primer reporte del efecto cooperativo de las vitaminas C y E para todo el proceso reproductivo en camarones peneidos. Se demostró que la suplementación con vitamina C y E en dietas para reproductores mejoró el comportamiento reproductivo y la velocidad de metamorfosis de nauplio a zoea I; el efecto cooperativo de la vitamina C sobre la E se observó en tejidos y huevos de las hembras, pero es dependiente del status de la vitamina C y E en los tejidos; la vitamina E puede tener también la habilidad de cooperar con la C y también depende de la concentración de la vitamina C en los tejidos.

En los huevos de *M. japonicus*, el efecto cooperativo de la vitamina E sobre la vitamina C dependió del status de la vitamina C en los huevos. A los niveles dietéticos más altos de vitamina C la concentración de esta vitamina cambió significativamente cuando variaron los niveles de vitamina E. El efecto cooperativo de la vitamina E sobre la vitamina C en los huevos fue condicional y solo se observó a niveles de vitamina C por encima de 500 mg kg⁻¹ de dieta.

Ruff *et al.* (2002) estudiaron el efecto de combinaciones de las vitaminas E, C y HUFA en dietas para postlarvas (PL19) de *L. vannamei*. Los autores no pudieron llegar a conclusiones sobre la posible interacción entre la vitamina E y la vitamina C en los tratamientos utilizados. La dieta que contenía 2% de aceite de pescado, 200 mg kg⁻¹ de α -tocoferol y 100 mg kg⁻¹ de ácido ascórbico mostró un mejor crecimiento que la que contenía 5% de aceite de pescado, 200 mg kg⁻¹ de α -tocoferol y 100 mg kg⁻¹ de ácido ascórbico. La dieta que contenía 5% de aceite de pescado 900 mg kg⁻¹ α -TA and 100 mg kg⁻¹ AA tuvo niveles más elevados de ácidos grasos poliinsaturados de la serie ω -6 que la de 5% de aceite de pescado con 200 mg kg⁻¹ de α -tocoferol y 100 mg kg⁻¹ de ácido ascórbico. El estado oxidativo de los tejidos de

las postlarvas fue igual en todos los tratamientos. Los niveles de α -tocoferol y ácido ascórbico en los tejidos fueron altamente dependientes de sus niveles en la dieta y no se encontró correlación entre los niveles de ambas vitaminas.

Probablemente el efecto encontrado en los niveles más altos de ácidos grasos serie ω -6 en la dieta con 900 mg kg⁻¹ α -TA se debió al efecto protector de la peroxidación que ejerció la vitamina E.

Wouters *et al.* (2001) al estudiar el contenido de lípidos, los lípidos por clase, el contenido de ácidos grasos y de las vitaminas C y E durante diferentes etapas de la maduración sexual, observaron que la concentración de vitamina C en los ovarios, inmaduros, madurando y maduros era alta y superior a la informada por otros autores, lo que atribuyeron a diferencias en la dieta. El análisis de sus resultados los llevó a sugerir que la vitamina E se utiliza durante el desarrollo del huevo y la eclosión. Cahu *et al.* (1995) consideraron que las altas concentraciones de vitamina C encontradas en los huevos de *Fenneropenaeus indicus*, inducen una mejor eclosión ya que en esta etapa la vitamina juega un papel beneficioso para el desarrollo embrionario, debido a su participación en la hidroxilación de la lisina y la prolina durante el proceso de síntesis de colágeno. Los autores encontraron un incremento en la concentración de vitamina E en el ovario durante la maduración sexual de *L. vannamei* por lo que le atribuyeron un papel importante en el proceso de maduración. La reducción en los ovarios después del desove y la recuperación de los niveles en los nauplios aporta más evidencias de la importancia de la vitamina en el desarrollo larval y enfatizan la importancia de esta vitamina como constituyente de las membranas celulares. Aunque hasta este momento el análisis de ambas vitaminas se basó en funciones independientes, los autores consideran que puede haber un efecto sinérgico entre ambas en su papel como antioxidantes que se justifica por la disminución de los niveles de ácido ascórbico y aumento de los de α -tocoferol en nauplios, justificado por la recuperación que ejerce el ácido ascórbico en la regeneración de α -tocoferol después de la oxidación.

Darvishpour *et al.* (2012), al estudiar los efectos individuales y combinados de las vitaminas A, E y C en postlarvas de *L. vannamei* alimentadas con *Artemia spp.* enriquecida, no encontraron una mejor respuesta en el tratamiento combinado en cuanto a crecimiento y sobrevivencia, ni después del estrés salino. Aunque las tres vitaminas individualmente

mostraron efectos positivos en alguno de los parámetros, especialmente la vitamina E en el crecimiento y la sobrevivencia de las postlarvas.

Como puede observarse al analizar las investigaciones relacionadas con las interacciones entre las vitaminas C y E, aún persisten lagunas en cuanto a la cantidad relativa recomendada para observar los efectos cooperativos entre ambas, aunque si queda claro que individualmente son esenciales para los camarones en cuanto a crecimiento, sobrevivencia y comportamiento reproductivo. Otro aspecto importante a considerar es el nivel de ácidos grasos poli y altamente insaturados que contenga la dieta.

Tabla 2. Interacciones entre las vitaminas C y E

Especie	Fuente vitaminas E /C	Niveles de ambas vitaminas empleados en las dietas	Efectos observados	Parámetros evaluados	Referencia
<i>Fenneropenaeus indicus</i> hembras reproductoras	DL- α -tocoferil acetato/AA encapsulado	HE-600 mg kg ⁻¹ , LE-0 mg.kg ⁻¹ ; HC-2500 LC-1000 30 mg aceite de hígado de bacalao	Aumento del α -tocoferil acetato en huevos y órganos, mejor eclosión con la concentración más alta de AA	Lípidos, ácidos grasos poliinsaturados, número de huevos por desove	Cahu <i>et al.</i> (1995)
<i>Fenneropenaeus indicus</i> hembras reproductoras			Etapas de la maduración sexual	lípidos, lípidos por clase, ácidos grasos, vitaminas C y E.	Wouters <i>et al.</i> (2001b)

Tabla 2 (cont.). Interacciones entre las vitaminas C y E

Especie	Fuente vitaminas E /C	Niveles de ambas vitaminas empleados en las dietas	Efectos observados	Parámetros evaluados	Referencia
<i>Litopenaeus vannamei</i> , juveniles		150 mg.kg ⁻¹ de vitamina E con 500 de vitamina C y 50 mg kg ⁻¹ de vitamina E con 50 de vitamina C + 75 de β-glucanos.	Mejor respuesta inmunitaria frente a desafío con VMB	anión superóxido, actividad fenoloxidasa actividad antibacteriana proteínas totales, conteo de hemocitos	Molina <i>et al.</i> (2002)
<i>L. vannamei</i> PL 19	Acetato de α-tocoferol AA	2% de aceite de pescado, 200 mg kg ⁻¹ de α-tocoferol y 100 mg kg ⁻¹ de ácido ascórbico mostró el mejor resultado.	Crecimiento Niveles de las vitaminas en los tejidos. No se encontró correlación.	Estado oxidativo AGPI serie ω-6	Ruff <i>et al.</i> (2002)
<i>L. vannamei</i> postlarvae	vitamina E/palmitato de ascorbilo	T2: AE con vitamina C T3: AE con vit. E y T4: AE con vitaminas A, E y C	No hubo diferencias en la longitud total, mayor peso y TCE en T3; después del estrés salino la mejor SR en T3.	Longitud total, TCE, S%, Estrés salino	Darvishpour <i>et al.</i> (2012)
<i>Marsupenaeus japonicus</i> hembras	DL-α-tocoferol /AA	vitamina C 0, 500 y 1000 mg kg ⁻¹ ; vitamina E 0, 300 y 600	Aumento de la velocidad de metamorfosis de nauplio a	Comportamiento reproductivo, calidad de las larvas y concentración de	Nguyen <i>et al.</i> (2012)

			zoea 1. Efecto cooperativo entre ambas vitaminas.	las vitaminas en el cuerpo	
--	--	--	---	----------------------------	--

Abreviaturas

AA: ácido ascórbico; AE: Artemia enriquecida; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados; HC: dietas altas en vitamina C; HE: dieta alta en vitamina E; LC: dietas bajas en vitamina C; LE: dieta baja en vitamina E; S%: sobrevivencia; TCS: Tasa de crecimiento específica; VMB: virus de la mancha blanca

Conclusiones

La literatura existente demuestra la esencialidad de la vitamina C para los camarones peneidos. Su efecto en el crecimiento, la maduración, la inmunoestimulación y el estrés y las interrelaciones de las vitaminas C y E varían con las especies, la forma y proporción de suministrar ambas vitaminas, entre otras causas. Futuras investigaciones deben realizarse en cada uno de estos aspectos para una mayor comprensión de los mecanismos que regulan estos comportamientos.

Referencias

- Ai Q.H., Mai K.S, Tan B.P., Xu W. *et al.* (2006) Effects of dietary vitamin C on survival, growth and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture* **261**, 327-336.
- Alava V., Kanazawa A., Teshima S and Koshio S. (1993) Effect of dietary L-ascorbyl-2-phosphate magnesium on gonadal maturation of *Penaeus japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**(4), 691-696.
- Alfaro-Montoya J. (2010) The reproductive conditions of male shrimps, genus *Penaeus*, sub-genus *Litopenaeus* (open thelyca penaeoid shrimps): A review. *Aquaculture* **300**, 1-9.
- Bray, W.A. and Lawrence A.L. (1992) Reproduction of *Penaeus* species in captivity pp.93-190 (ed. By Fast A.W. y Lester J.). *Marine shrimp culture: principles and practices*.
- Cahu C. (2000) Dietas para reproductores de camarones y su efecto en la calidad larvaria. Pp.65-72. En: Civera-Cerecedo R., Ricque-Marie D., Cruz-suárez E. (eds). Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Nov.15-18, 1998, La Paz, México.
- Catacutan M.R. and Lavilla-Pitogo C.R. (1994) L-ascorbyl-2-phosphate Mg as a source of vitamin C for juvenile *Penaeus monodon*. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* **46**, 40-47.
- Chamberlain G.W. (1988) Stepwise investigation of environmental and nutritional requirements for reproduction of penaeid shrimp. *PhD dissertation, Department of Wildlife and Fisheries Science, Texas A&M University, TX, USA*.
- Chatterjee G.C. (1967) Effects of ascorbic acid deficiency in animal (ed. by W.H. Sibrell and R.S. Harris). *Vitamin1*, 407-456. Academic Press, N.Y.
- Chatterjee I.B. (1973) Evolution and biosynthesis of ascorbic acid. *Science* **182**, 1271-1271.
- Chen C-J, Gao Y-S, Xie S-W, Niu J., Yang F., *et al.* (2017). Effect body composition antioxidative capacity and salinity stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research* **48**, 4608-4622.
- Chen H-Y and Chang C-F (1994) Quantification of vitamin C requirements for juvenile shrimp (*Penaeus monodon*) using polyphosphorylated L-ascorbic acid. *Journal of Nutrition* **124**, 2033-2038.
- Chen S-J, Gao Y-S, Xie S-W, Niu J, Yang F. *et al.* (2017) Effect of L-ascorbyl-2-polyphosphate supplementation on growth performance of juvenile Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research* **48**, 4608-4622.
- Conklin D.E. (1997) Vitamins In: *Crustacean Nutrition* (ed by L.R.Abramo, Conklin D.E. y Akiyama P.E.). *World Aquaculture Society*, 149 p.
- Dabrowski K. (1990) Ascorbic acid states in the early life of whitefish *Coregonus lavaretus* L. *Aquaculture* **82**, 61-70
- Darvishpour H., Yahyavi, M., Mohammadzadeh, F. and Javadzadeh, M. (2012) Effects of vitamins A, C, E and their combination on growth and survival of *Litopenaeus vannamei* post larvae. *Advanced Studies in Biology*, **4**(5), 245 – 253

- Dawood M.A. and Koshio S. (2018) Vitamin supplementation to optimize growth, health and stress resistance in aquatic animal. *Reviews in Aquaculture* **10**, 334-350.
- Deshimaru O. and Kuroki K. (1976) Studies on a purified diet for prawn. Adequate dietary levels of ascorbic acid and inositol. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* **42**, 571-576.
- Du S., Hu C. and Shen Q. (2004) Effect of dietary ascorbic acid levels on reproductive performance of shrimp, *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Journal shellfisheries Research*, 1-10.
- FAO (2016) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.
- FAO (2018) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. 248 p.
- Fenucci, J., Fernández A. (2004). Acción de las vitaminas en la dieta de camarones Penaeoideos. (ed. by Cruz Suárez L.E., Ricque Marie D., Nieto M.G., Villareal D., Scholz U. y González M (2004) *Avances en Nutrición Acuicola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola* 16-19 Noviembre, Hermosillo, Sonora, México.
- Gabaudan J. and Verlhac V. (2001) Critical reviews of the requirements of ascorbic acid in cold and cool waters fishes (salmonids, percids, plecoglossids and flatfishes. (ed. by K. Dabrowski). *Ascorbic acid in aquatic organisms. Status and perspectives*). CRC Press, 288p.
- García-Galano T., Rodríguez-Ramos T. y Carrillo O. (2007) Efecto del lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* y del amonio disuelto sobre las concentraciones de ácido ascórbico en tejidos del camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.* **28**(31), 247-252.
- Groff J.L. and Croppa S.S. (1999) Advanced nutrition and human metabolism (ed. by Wasworth), 245-260.
- Guillaume J., Kaushik S., Bergot P. and Metailler R. (2001) Nutrition and feeding of fish and crustaceans. *Praxis Publishing Ltd*, Chichester UK.
- Harrison K.E. (1990) The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *J. Shellfish Res* **9**1, 1-28.
- He H. and Lawrence A.L. (1993) Vitamin C requirements of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **114**, 305-316.
- Hsu T-S and Shiau S-Y (1997) Comparison of L-ascorbyl-2-polyphosphate with L-ascorbyl-2-sulfate in meeting vitamin C requirements of juvenile grass shrimp *Penaeus monodon*. *Fisheries Science* **63**(6), 958-962.
- Hudinaga M. (1935) Study about development of *Penaeus japonius* (Bate). *Rep Hayatomo Fish. Int.* **1**(1), 1-51.
- Hunter B., Magarelli P.C., Lightner D.V. and Colvin L.B. (1979) Ascorbic acid depend collagen formation in penaeid shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* **64B**, 181-185.
- Jobling M. (2016) Fish nutrition research: past, present and future. *Aquacult. Int.* **24**, 767-786.

- Kanazawa A. (1996) Recent developments in shrimp nutrition and feed industry. *Current Reviews in Fisheries Science* (Proceedings 5th IWGCN symposium, Kagoshima, Japan, april 1995).
- Kontara E.K., Merchie G., Lavens P., Robles R., Nelis H., Iecher D. and Sorgeloos P. (1997). Improved production of postlarva white shrimp through supplementation of L. ascorbyl-2-polyphosphate in the diet. *Aquacult. Int.* **5**, 127-136.
- Lavens P., Merchie G., Ramos X., Kumar L-H, Van Hauweert A., Pedarzzoli A., and DeLeenheer A. (1999). Supplementation of ascorbic acid 2-monophosphate during the early postlarval nutrition of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* **5**, 205-209.
- Le Moullac G. and Haffner P. (2000) Enviromental factors affecting immune response in crustaceans. *Aquaculture* **191**, 121-131.
- Lee N-H and Shiao S-Y (2002) Dietary vitamin C and its derivatives affect immune response in grass shrimp *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology* **12**, 119-129.
- Lee N-H and Shiao S-Y (2003) Increase of dietary vitamin C improves hemocyte respiratory bursh response and growth of juvenile grass shrimp *Penaeus monodon* fed with high dietary copper. *Fish and Shellfish Immunology* **14**, 305-215.
- Leung-Trujillo J. and Lawrence A.L. (1988). The effect of ascorbic acido n sperm and spermathphore quality in *Penaeus vannamei* males fed prepared diets. *J. World Aquac. Soc.* **19**, 46A.
- Ligtner D.V., Hunter B., Magarelli P., and Colvin L. (1979) Ascorbic acid: Nutritional requirement and role in wound repair in penaeid shrimp. *Proc. World Maricult. Soc.* **10**, 513-528.
- Lovell R.T. (2001) Dietary requirements of ascorbic acid by warmwater fish. (ed. by K. Dabrowski). *Acorbic acid in aquatic organims. Status and perspectives*. CRC Press, 288p.
- Merchie G., Kontara E., Lavens P., Robles R., Kurmaly K. and Sorgeloos P. (1998) Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarvae tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture research* **29**, 579-585.
- Merchie G., Lavens P. and Sorgeloos P. (1997a) Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae:a review. *Aquaculture* **155**, 165-181.
- Merchie G., Lavens P., Kontara E., Ramos Y., Kujar L., Haawerart H., Pedrazzoli A., Nelis E., and Sorgeloos P. (1997b) Supplementation of ascorbic acid and 2 phosphates during the early postlarval stages of peneid shrimp (*Penaeus monodon* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*.
- Moe Y.Y., Koshio S., Teshima S., Ishikawa M., Matsunaja Y. and Panganiban A. (2004). Effect of vitamin C derivatives on the performance of larval kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture* **242**, 501-512.
- Moe, Y., Koshio S., Ishikawa M., Teshima S., Pangamban A., Moe T., Michael F y Ren T. (2005) Vitamin requirement of kuruma shrimp postlarvae *Marsupenaeus japonicus* Bate, using L-ascorbyl-2-monophosphate-Na/Ca. *Aquaculture Research* **36**, 739-745.

- Molina C., Rodríguez J., Arango J., Echevarría F, Sotomayor M. (2002) Efectos combinados de las vitaminas C y E dietéticas en la inmunorespuesta de juveniles de *Litopenaeus vannamei* antes y después de la suplementación con glucanos. VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. *El Mundo Acuicola* **8**, 29-33.
- Montoya N. and Molina C. (1995) Optimum supplemental level of L-ascorbyl-2-phosphate-Mg to diet for white shrimps *Penaeus vannamei*. *Fisheries Science* **61**(6), 1045-1046.
- Moreau R., Cuzón G. and Gabaudan J. (1998) Efficacy of silicone-coated ascorbic acid and ascorbyl-2-polyphosphate to fast-growing tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture Nutrition* **4**, 23-29.
- Nelson D.L. and Cox M.M. (2018) Lehninger Principios de Bioquímica (7ma ed., Editorial Omega, España).
- Nguyen B.T., Sakiyama S., Harakawa S., Mamang R. et al. (2012) Effects of dietary vitamin C and E and their interactions on reproduction performance, larval quality and tissue vitamin content in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* Bate. *Aquaculture* **334**, 73-81.
- Niu J., Tian L.X., Liu Y.J., Mai K.S., Ye CX and Gao W. (2009) Nutrient values of dietary ascorbic acid (L-ascorbyl-2-polyphosphate) on growth, survival and stress tolerance of larval shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* **15**, 194-201.
- Pérez-Velázquez M., González-Félix M.L., Lawrence A.L., Bray W.A., Gatlin III D.M. (2003) Dietary effects on sperm quality of *Litopenaeus vannamei* broodstock. *J. World Aquac. Soc.* **34** (1), 92–98.
- Quiao J, Du Z., Zang Y., Du H., Gao L. et al. (2011) Proteomic identification of the related immune enhancing protein in shrimp *Litopenaeus vannamei* stimulated with vitamin C and chinese herbs. *Fish shellfish Immunol.* **31**, 736-745.
- Ramos L., González M., Morera M. y Rodríguez-Ramos, T. (2019) Maduración y reproducción en cautiverio del camarón blanco *Litopenaeus schmitti* Burkenroad en Cuba. *Rev. Invest. Mar.* **39**(1), 22-41.
- Ruff N., Lavens P., De Leencheer H., Huo J., Sorgeloos P. and Nelis H. (2002) Antioxidant effect of dietary tocopherol and ascorbic acid on growth and survival of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture International* **9**, 115-126.
- Shiau S-Y (2001) Vitamin C requirement in crustacean. (ed. by K. Dabrowski). *Ascorbic acid in aquatic organisms. Status and perspectives*. CRC Press, 288p.
- Shigueno K. and Ithoh S. (1988). Use of Mg-L-ascorbyl-2-phosphate as a vitamin C source in shrimp diets. *Journal of the World Aquaculture Society* **19**(4), 168-174.
- Traber M.G. (2014) Vitamin E (ed by: Ross A., Caballero B., Cursins S., Tucker K. and Zeigle T.). *Modern nutrition, health and disease*. Philadelphia.
- Treece G.D. (2000) Shrimp culture. In: *Encyclopedia of Aquaculture* (ed. by R. Stickney), John Wiley and Sons Inc., 805-865.
- Wouters R., Molina C., Lavens P. y Calderón J. (2001a) Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stages of sexual maturation. *Aquaculture* **198**, 307-323.
- Wouters R.P., Lavens P., Nieto J. and Sorgeloos P. (2001b) Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture* **202**, 1-21.

- Wu Y-S, Lian S-T, Huang C-T, Nau F-H (2016) Beta 1,3/1,6 glucan and vitamin C immunoestimulate the nonspecific immune response of White shrimp (*Litopenaeus vannamei*. *Fish shellfish Immunol.* **57**, 269-272.
- Xian J.A., Wang C.X., Ye X.D., Chen W.N. (2010) Respiratory burst, cytoplasmatic free-Ca concentration and apoptotic cell ratio of hemocytes from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* under acute copper stress. *Comp. Biochem. Physiol.C Toxicol. Pharmacol* **152**, 182-188.
- Xu Z, Lin T., Lei Q. and Li A. (1994) Studies on vitamin nutrition for the prawn *Penaeus chinensis*. 5 Nutritional studies on prawn *Penaeus chinensis* for vitamin C. *J. Ocean Univ. Qingdao* **24**(3), 364-372.
- Zang Y, Yan F., Hu Z., et al. (2009) Hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei* shows hemolytic activity. *Fish shellfish Immunol.* **27**, 330-335.

Estado Actual del Desarrollo Acuícola, la Alimentación y la Nutrición de los Centropómidos

Martín Arenas^{1*}, Álvaro Barreto² y Gabriela Gaxiola³

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

²Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit, México

³UMDI, SISAL, Facultad de Ciencias, UNAM, México

*Autor correspondiente: arenas.pardo@gmail.com

Resumen

Los Centropómidos son especies tropicales-subtropicales, su distribución se encuentra restringida al continente americano. Son importantes recreativa y comercialmente; principalmente por las pesquerías rivereñas (ribereñas)?. Los Centropómidos son eurihalinos, de rápido crecimiento, se adaptan al cautiverio, consumo de alimento inerte y su carne es de gran calidad nutricional, estas características las hacen candidatas para la acuicultura. De las 12 especies que componen el género sólo cuatro han sido de interés por los investigadores; las de mayor tamaño (*Centropomus undecimalis*, *C. parallelus*, *C. viridis* y *C. poeyi*), principalmente en el establecimiento de los protocolos de reproducción y cría larvaria. Por otra parte, sólo en *C. undecimalis* y *C. parallelus* se ha profundizado en los aspectos nutricionales, los cuales se han enfocado en determinar los requerimientos de proteína dietética y la búsqueda de fuentes de proteína alternas a la harina de pescado en la formulación de alimentos balanceado. En el presente trabajo se hace una revisión general del estado del desarrollo acuícola actual de los Centropómidos.

Palabras claves: Centropómidos, nutrición, salinidad.

Introducción

La acuicultura es el sector productor de alimentos con el crecimiento más alto y el cultivo de peces es una de las actividades que está en constante incremento (FAO, 2018). Los Centropómidos son importantes recreativa y comercialmente importantes para las pesquerías (Caballero-Chávez, 2012; Maldonado-García *et al.*, 2005; Motta *et al.*, 2016; Muller & Taylor, 2012). Son especies candidatas para la acuicultura, debido a su alto valor nutricional, rápido crecimiento, adaptación al cautiverio y al consumo de alimento inerte (Tucker *et al.*, 1985; Tucker, 1987a). El género *Centropomus* está conformado por 12 especies, seis se encuentran en el Atlántico Occidental (*C. undecimalis*, *C. mexicanus*, *C. paralellus*, *C. poeyi*, *C. pectinatus* y *C. ensiferus*) y el resto en el Pacífico Oriental (*C. viridis*, *C. unionensis*, *C. robalito*, *C. medius*, *C. armatus* y *C. nigrescens*) (Rivas, 1986), sólo a *C. undecimalis* y *C. paralellus* se les ha puesto gran interés en desarrollar su tecnología de cultivo (Alvarez-Lajonchère & Tsuzuki, 2008), pero principalmente a *C. undecimalis* (Alvarez-Lajonchère & Taylor, 2003; Alvarez-Lajonchère & Ibarra-Castro, 2013). En la última década *C. viridis* y *C. poeyi* han sido de interés por los investigadores, principalmente en el establecimiento de los protocolos de reproducción y cría larvaria (Ibarra-Castro *et al.*, 2017; Vidal Lopez *et al.*, 2019). Por otra parte, en *C. nigrescens* y *C. ensiferus* sólo se ha tratado de establecer la mejor condición de cultivo en función de la condición de salinidad (Nonell, 1995; Suárez-Bautista & Rodríguez-Forero, 2015).

Sin embargo, el estado actual del desarrollo acuícola de los Centropómidos se ha enfocado en establecer los protocolos de reproducción y cría larvaria, dejando de lado el desarrollo nutricional. En este trabajo se realiza una revisión general del estado actual del desarrollo de la tecnología de cultivo de los Centropómidos, considerando todos los aspectos relacionados.

Ecología de los Centropómidos

Los Centropómidos son peces tropicales-subtropicales, catalogados como estenotermos, la temperatura mínima letal reportada es de 15°C (Gilmore *et al.*, 1978), presentan una reproducción de tipo hermafrodita protándrica (Freitas & Abilhoa, 2017; Gassman *et al.*,

2016; Taylor *et al.*, 2000; Vidal-López *et al.*, 2019), por lo tanto, las hembras son mayores que los machos (Tabla 1). La reproducción se lleva a cabo en zonas de alta salinidad, en estuarios o en la costa (Peters *et al.*, 1998), los periodos de reproducción se encuentra principalmente influenciados por la temperatura del agua y la presencia de lluvias. La temperatura afecta la reproducción en forma latitudinal (Tabla 1) y la presencia/ausencia de lluvias puede desfasar la temporada de reproducción (Andrade *et al.*, 2013 ;Lorán-Núñez *et al.*, 2012). La lluvia transporta materia orgánica, limos y arcillas del continente hacia la costa (Lorán-Núñez *et al.*, 2012), lo que origina un aumento en la concentración de clorofila *a* (productividad primaria) (Andrade *et al.*, 2013), condición que da lugar a la aparición de una trama trófica, lo que asegura la supervivencia de las larvas y juveniles de los Centropómidos (Aliaume *et al.*, 2000).

Tabla 1. Temperatura del agua, talla de madurez, relación macho: hembra y temporada de reproducción de los Centropómidos.

Especie	Picos de reproducción	Talla de madurez (cm)	Relación (♂:♀)	Temperatura (°C)	Autor
<i>C. ensiferus</i> (Venezuela)	febrero-abril Agosto-septiembre	♀ = 26.0 LT ♂ = 21.5 LT	1:3.3	-	Gassman <i>et al.</i> (2016)
<i>C. undecimalis</i> (Venezuela)	Febrero	♀ = 73.6 LT ♂ = 59.3 LT	1.5:1	-	Gassman <i>et al.</i> (2016)
<i>C. pecnitatus</i> (Brasil)	Junio-agosto	24.0 LT	1:1.4	<26	Freitas & Abilhoa (2017)
<i>C. medius</i> (México)	Septiembre - noviembre	♀ = 39.0 ♂ = 33.0	1:1.6	>22	(Maldonado-García <i>et al.</i> (2005)
<i>C. poeyi</i> (México)	Junio-agosto	♀ = 78.9 LT ♂ = 72.7 LT	1:2.1	28-31	Lorán-Núñez <i>et al.</i> (2012)
<i>C. undecimalis</i> (México)	Junio-agosto	♀ = 81.6 LT ♂ = 77.3 LT	1:0.9	28-31	Lorán-Núñez <i>et al.</i> (2012)
<i>C. undecimalis</i> (EUA)	Julio-septiembre	-	1:1	25-30	Taylor <i>et al.</i> (1998)
<i>C. undecimalis</i> (EUA)	Mayo-julio	♀ = 434-560 LS ♂ = 330-348 LS	-	>22-23	Peters <i>et al.</i> (1998)

<i>C. undecimalis</i> (México)	Julio-agosto	♀ = 80.0 LF ♂ = 60.0 LF	1:0.68	28-30	Perera-García <i>et al.</i> , (2011)
-----------------------------------	--------------	----------------------------	--------	-------	---

LS = Longitud estándar.

LF = Longitud furcal.

LT = Longitud total.

Los Centropómidos, durante la etapa juvenil habitan ríos, marismas, pastos marinos y zonas de manglar, donde la temperatura puede variar de 16-35.6°C, la salinidad de 0-30 ups y las condiciones de oxígeno disuelto pueden ser anóxicas hasta muy oxigenadas (Aliaume *et al.*, 1997; Gilmore *et al.*, 1983; McMichael *et al.*, 1989). Los Centropómidos presentan hábitos carnívoros y son catalogados como depredadores generalistas, durante las primeras fases de desarrollo (juveniles tempranos) se alimentan del zooplancton (principalmente copépodos), posteriormente en etapas mayores prefieren peces y crustáceos (Aliaume *et al.*, 1997; Blewett *et al.*, 2006; Contente *et al.*, 2009; Dutka-Gianelli, 2014; Flores-Ortega *et al.*, 2015; Gilmore *et al.*, 1983; McMichael *et al.*, 1989; Tonini *et al.*, 2004).

Reproducción en cautiverio de Centropómidos

La reproducción del género *Centropomus* en condiciones de laboratorio se ha limitado a unas cuantas especies, las de mayor tamaño: *C. undecimalis* (Cruz-Botto *et al.*, 2018; Ibarra-Castro *et al.*, 2011), *C. parallelus* (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2002), *C. poeyi* (Vidal Lopez *et al.*, 2019) y *C. viridis* (Ibarra-Castro *et al.*, 2017). La reproducción en cautiverio se caracteriza por llevarse a cabo en condiciones estables de salinidad (agua marina), temperatura (27-29°C) y fotoperíodo (natural). Sin embargo, aunque la maduración sexual y desarrollo gonadal ocurren, la fase de maduración final de los ovocitos en la gónada femenina no finaliza, esto evita que se lleve a cabo el desove natural. Los mecanismos endocrinos que permiten el desarrollo gonadal y los desoves naturales dependen de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) por el hipotálamo, la GnRH estimula la liberación de las gonadotropina (GtH I y II) por la glándula pituitaria; la hormona estimuladora folicular (FSH o GtH I) estimula la secreción de la hormona 17β-estradiol (E₂) en la gónada (Figura 1), la cual da inicio a la vitelogénesis; la hormona luteinizante (LH o

GtH II) regula la maduración final de ovocitos (FOM) (Mylonas & Zohar, 2000). En los peces en cautiverio la ausencia en la liberación de la LH por la pituitaria no permite la FOM y evita el desove natural (Mylonas *et al.*, 1997). Los peces del género *Centropomus* que han sido reproducidos en cautiverio necesitaron de la aplicación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRHa) y gonadotropina coriónica humana (hCG) para poder llegar a la fase de maduración final de ovocitos (FOM) y estimular el desove (Tabla 2).

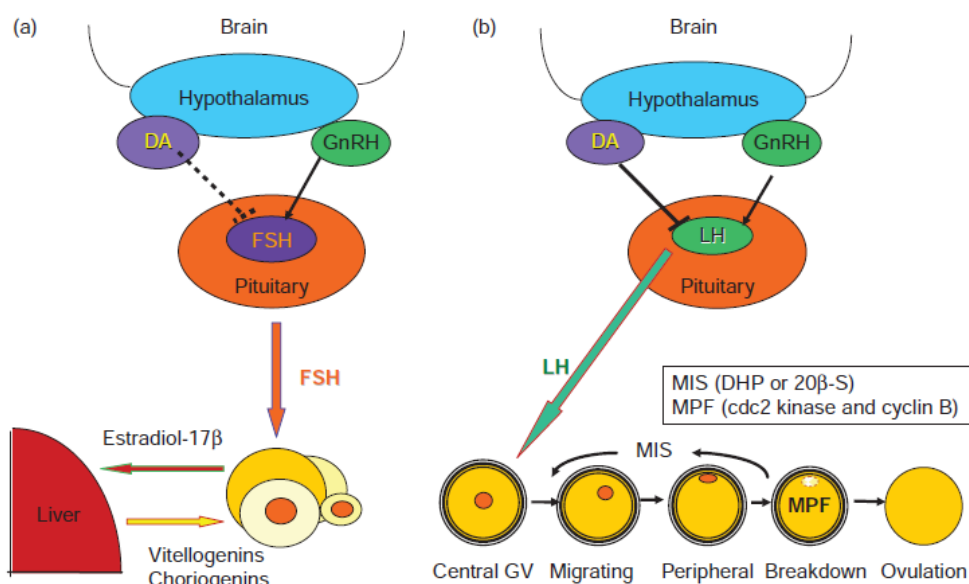


Figura 1. (a) Visión general de la cadena endocrina, eje cerebro-pituitaria-gonada en hembra de peces durante la fase de vitelogenesis. (b) Visión general del eje cerebro-pituitaria-gonada durante la maduración final de ovocitos y ovulación. Tomado de Yaron & Levavi-Sivan (2011).

Las estrategias de reproducción en los peces del género *Centropomus* en condiciones de cautiverio varían en función del estudio. Los reproductores pueden ser capturados del medio en temporada de reproducción (Cerqueira & Tsuzuki, 2009) o con anticipación y mantenerlos como reproductores de planta, sin embargo, lo anterior involucra una previa alimentación antes de la temporada de reproducción (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2002; Ibarra-Castro *et al.*, 2011; Ibarra-Castro *et al.*, 2017). En cautiverio la alimentación es un factor limitante en la fecundidad de los peces (Scott, 1962), las estrategias de alimentación de los reproductores

son raramente descritas en las publicaciones, solamente Ibarra-Castro *et al.* (2011) han descrito el regimen alimenticio que utilizaron en *C. undecimalis*, el cual consistió en una combiación de alimento comercial, suplementos vitamínicos, ácidos grasos esenciales y pescado fresco.

Tabla 2. Hormonas estimuladoras de la maduración final de ovocitos y dosis en la reproducción del género *Centropomus*.

Hormona	Dosis	Especie	Autor
LHRHa	50 µg kg ⁻¹	<i>C. parallelus</i>	Alvarez-Lajoncherei <i>et al.</i> (2002)
GnRHa	121 µg kg ⁻¹	<i>C. undecimalis</i>	Ibarra-Castro <i>et al.</i> (2011)
LHRHa	130 mg kg ⁻¹	<i>C. viridis</i>	Ibarra-Castro <i>et al.</i> (2017)
hCG	0.5-1 u g ⁻¹	<i>C. undecimalis</i>	Tucker (1987)
LHRHa	200 µg fish ⁻¹	<i>C. poeyi</i>	Vidal Lopez <i>et al.</i> (2019)

Uno de los principales desafíos que podría enfrentar la reproducción de Centropómidos obtenidos en cautiverio (F1) es la disponibilidad de un lote de hembras, debido a su tipo de reproducción hermafrodita protándrica. Sin embargo, en la última década se ha puesto especial interés en la evaluación de la hormona esteroide sexual femenina 17β-estradiol (E₂) sobre la reversión sexual de los Centropómidos en los que se ha logrado llevar a cabo su reproducción, a excepción de *C. viris*. Los estudios se han enfocado en evaluar la dosis efectiva y tiempo óptimo de aplicación, los resultados han sido exitosos, se ha obtenido hasta un 100% de reversión sexual en *C. parallelus*, *C. poeyi* y *C. undecimalis* (Tabla 3).

Tabla 3. Dosis y tiempo de aplicación de la hormona 17β-estradiol en la feminización de los Centropómidos.

Especie	Dosis de 17β-estradiol	Reversión (%)	Peso (g)	Tiempo (días)	Autor
<i>C. undecimalis</i>	50 mg kg ⁻¹ en alimento	93	46.8	21	Vidal-lópez <i>et al.</i> (2012)
<i>C. parallelus</i>	25 mg kg ⁻¹ en alimento	100	3.39	45	Carvalho <i>et al.</i> (2014)
<i>C. undecimalis</i>	0.5 mg kg ⁻¹ en implante	100	383.0	90	Passini <i>et al.</i> (2016)
<i>C. poeyi</i>	50 mg kg ⁻¹ en alimento	100	30.1	60	Vidal Lopez <i>et al.</i> (2019)

Arenas, M., Barreto, A. y Gaxiola, G. 2019. Estado Actual del Desarrollo Acuicola, la Alimentación y la Nutrición de los Centropómidos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 132-149.

Estrategias de alimentación durante la cría larvaria en Centropómidos

La alimentación es el principal problema del cultivo en cautiverio de las larvas de peces, debido al tamaño de partícula del alimento y calidad nutricional. El uso de organismos vivos es comúnmente utilizado en los primeros días de cultivo de larvas de peces después de consumir por completo las reservas del saco vitelino, en ese momento los aminoácidos libres juegan un papel importante durante la transición de la alimentación endógena a exógena, debido a que son utilizados como sustratos energéticos y síntesis de proteína al mismo tiempo (Fyhn, 1989). La artemia y los rotíferos son comúnmente utilizados como alimento vivo, pero nutricionalmente son deficientes en ácidos grasos polinsaturados como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), por lo tanto, se enriquecen con una emulsión de ácidos grasos polinsaturados de origen de pescado o son alimentados con microalgas ricas en estos ácidos grasos (Leger *et al.*, 1986). Los ácidos grasos polinsaturados son importantes para un adecuado desarrollo, respuesta inmune y supervivencia en las larvas de peces (Sargent *et al.*, 1997).

En cautiverio, las larvas de *C. undecimalis* eclosionan a las 48 horas después de la fertilización y 36 horas después de la eclosión el saco vitelino es completamente absorbido, en ese momento las larvas ya presentan boca e intestino funcionales (Ibarra-Castro *et al.*, 2011). En *C. parallelus* la apertura de la boca es a las 72 horas después de la eclosión y el saco vitelino es absorbido completamente a las 120 horas de después de la eclosión (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2002). Las larvas de *C. undecimalis* durante los primeros días de alimentación exógena presentan una elevada actividad enzimática de proteasas alcalinas (tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa y carboxipeptidasa A), en el día 25-35 después de la eclosión la actividad de las proteasas ácidas empieza a elevarse, por lo que se considera que ya cuenta con un estómago funcional (Jimenez-Martinez *et al.*, 2012), en ese momento son considerados juveniles temprano y ya pueden consumir una dieta artificial (Soligo *et al.*, 2011).

Durante el inicio de la alimentación exógena, la densidad de presas o alimento vivo por mililitro es uno de los puntos más importantes en la alimentación debido al canibalismo que se presenta entre las larvas de peces, una densidad apropiada mejora la supervivencia de éstas

(Houde, 1975). Sin embargo, no existe una referencia universal que establezca las densidades óptimas, debido a que cada especie presenta comportamientos de alimentación distintas a otras, en *C. undecimalis* se utilizó una densidad de 40 huevos por litro en un tanque de 5,000 litros y un esquema de alimentación que incluyó una combinación de alimento vivo y artificial (contenido proteico > 50 %), que permitió obtener una supervivencia de 50.7 % de las larvas eclosionadas y 17 % hasta la etapa juvenil (Figura 2) (Ibarra-Castro *et al.*, 2011). Por otra parte, Alvarez-Lajoncherei *et al.* (2002) en *C. parallelus* utilizaron una densidad de siembra de huevos de 19.2 huevos por litro en un tanque de 100 litros, 3 días después de la eclosión utilizando un régimen alimenticio que incluyó *Nannochloropsis oculata*, *Brachionus plicatilis*, *B. rotundiformis* (enriquecido con vitaminas y ácidos grasos) y *Artemia* en diferentes concentraciones durante los primeros 36 días de cultivo, obteniendo una supervivencia del 90 % en eclosión y 25.5 % hasta la etapa juvenil en un tanque de 4,000 litros.

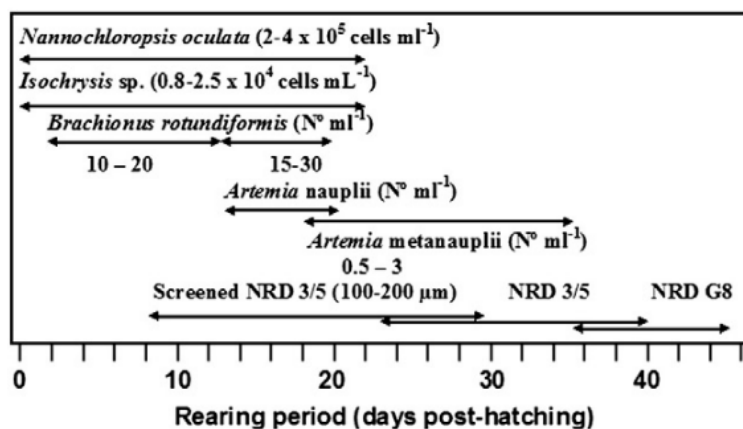


Figura 2. Régimen alimenticio de larvas y juveniles tempranos de *C. undecimalis* (Ibarra-Castro *et al.*, 2011).

El tiempo de transformación de larva a juvenil es relativamente similar entre las especies donde se ha establecido el protocolo de reproducción en cautiverio, en *C. undecimalis* en 45 días (22.5 mm) después de la eclosión alcanzan la etapa de juvenil (Alvarez-Lajoncherei & Tsuzuki, 2008; Ibarra-Castro *et al.*, 2011), en *C. parallelus* la metamorfosis completa se lleva a cabo a los 41 días (10 mm) (Cerqueira & Tsuzuki, 2009) y en *C. viridis* al día 42 (24.5 mm) son considerados juveniles (Ibarra-Castro *et al.*, 2017). La alimentación natural o viva a partir

de este momento se sustituye completamente por alimentación artificial y los organismos pasan a la etapa de nursery o guardería.

Requerimiento nutricional en juveniles de Centropómidos

De las 12 especies que componen el género *Centropomus*, sólo *C. undecimalis* y *C. parallelus* han sido objeto de estudio por los nutricionistas, principalmente en determinar sus requerimientos de proteína dietética (Tabla 4). Souza *et al.* (2011) estableció en *C. parallelus* un requerimiento de proteína dietética de 49%. En *C. undecimalis* a diferencia de *C. parallelus*, el requerimiento de proteína dietética ha sido estudiado en función de la condición de salinidad del cultivo. El requerimiento más bajo se registró en 12 ups (53.3%), el segundo menor fue en condiciones marinas (55%), sin embargo, existen dos autores que registraron diferentes resultados en salinidades cercanas a 0 ups (Tabla 3). Tucker (1987a) reporta un requerimiento de 53.4% en 0 ups y Concha-Frías *et al.* (2018) un 60% en 5 ups, las tasa de crecimiento específico son similares en ambos estudios. Las diferencias posiblemente se deban a la dureza del agua. Tucker (1987a) reporta una dureza de 269 mg L⁻¹ de CaCO₃ durante el cultivo, a pesar de que Concha-Frías *et al.* (2018) no reporta valores de dureza, la geología de la península de Yucatán, México, es kárstica, la concentración de la dureza del agua oscila entre valores de 400 a 850 mg L⁻¹ de CaCO₃ (Ávila *et al.*, 2004). Michelotti *et al.* (2018) reportaron que concentraciones iguales o superiores de dureza de 500 mg L⁻¹ de CaCO₃ en el agua dulce comprometen el crecimiento en *C. undecimalis*. Por otra parte, los dos estudios reportaron un crecimiento similar (TEC), probablemente en el estudio de Concha-Frías *et al.* (2018) los peces compensaron el gasto energético resultado de la osmorregulación del calcio, consumiendo más alimento y proteína, el FCA fue mayor en este estudio respecto a lo reportado por Tucker (1987a) (Tabla 3).

Tabla 3. Requerimiento de proteína de *C. undecimalis* y *C. parallelus*.

Especie	Salinidad (ups)	Peso inicial (g)	Requerimiento de proteína (%)	FCA	TEC (%)	Autor
<i>C. undecimalis</i>	0	18	53.8	0.74	2.00	Tucker (1987)
<i>C. undecimalis</i>	12	2.9	53.3	1.23	1.23	Gracia-López <i>et al.</i> (2003)
<i>C. parallelus</i>	35	4.8	48.5	1.50	0.80	Souza <i>et al.</i> (2011)
<i>C. undecimalis</i>	36	3.15	55.0	1.09	2.44	Concha-Frías <i>et al.</i> (2018)
<i>C. undecimalis</i>	5	3.15	60.0	1.21	2.18	Concha-Frías <i>et al.</i> (2018)

FCA = factor de conversión alimenticia; TEC = tasa específica de crecimiento.

La salinidad es un factor medio ambiental que ejerce gran influencia sobre las respuestas fisiológicas y energética en los peces. Bœuf & Payan (2001) catalogan a la salinidad como un factor determinante sobre el crecimiento de los peces, afectándolos de manera positiva o negativa. En los Centropómidos, la salinidad juega un papel importante durante su ciclo de vida, sin embargo, existe poca información sobre la historia de vida de cada uno de los integrantes del género *Centropomus*, la especie más estudiada desde el punto de vista ecológico ha sido *C. undecimalis*, principalmente en Florida, EUA. Gilmore *et al.* (1983) reportaron en *C. undecimalis* una relación positiva entre su crecimiento y la salinidad (Figura 3).

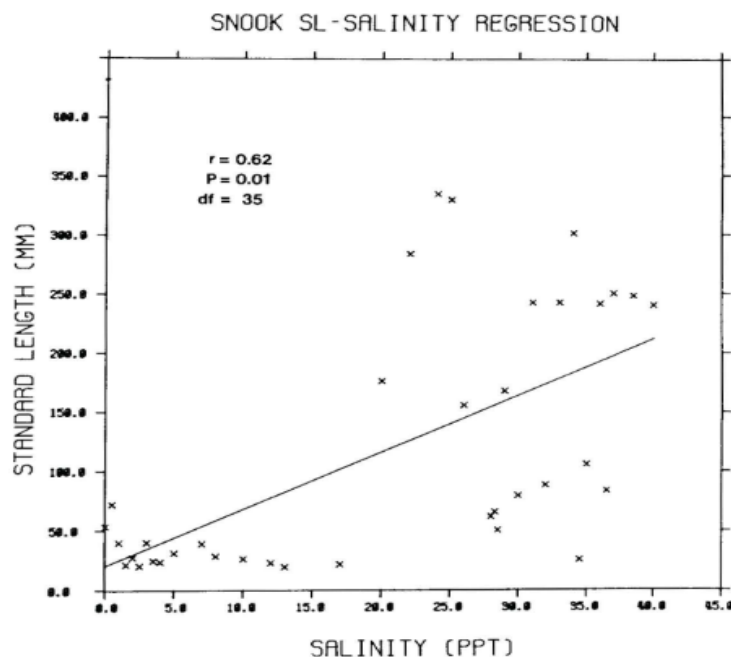


Figura 3. Relación entre la longitud estándar media del pez y la salinidad en *C. undecimalis*.

Tomado de Gilmore *et al.* (1983).

Por otra parte, el crecimiento del género *Centropomus* en función de la condición de salinidad ha sido objeto de estudio por varios investigadores. El principal objetivo de llevar a cabo estos estudios es determinar la mejor condición de cultivo, pero los resultados de crecimiento en función de la salinidad muestran discrepancia dentro de la misma especie, posiblemente por la alta heterogeneidad en el origen y la etapa de vida de los peces utilizados en cada estudio (Tabla 4).

Tabla 4. Mejor crecimiento del género *Centropomus* en función de la condición de la salinidad de cultivo.

Especie	Salinidad (ups)	Talla /Peso inicial	Origen	Autor
<i>C. undecimalis</i>	0	3 y 11 g	Cautiverio	Tucker (1987)
<i>C. nigrescens</i>	0, 18 y 36	2.55-12.1 g	Silvestre	Nonell (1995)
<i>C. parallelus</i>	5 y 20	1.4-2.7 g	Silvestres	Rocha <i>et al.</i> (2005)
<i>C. parallelus</i>	15	0.35 g – 26.4 mm	Cautiverio	Tsuzuki <i>et al.</i> (2007)
<i>C. undecimalis</i>	25 y 35	3.4-3.7 mm	Cautiverio	Rhody <i>et al.</i> (2010)
<i>C. ensiferus</i>	0, 10 y 20	9.8 g	Silvestre	Suárez-Bautista & Rodríguez-Forero (2015)
<i>C. undecimalis</i>	36	3.15 g	Cautiverio	Concha-Frías <i>et al.</i> (2018)

Los estudios que han evaluado el efecto de la salinidad sobre el metabolismo de los Centropómidos reportan que en salinidades cercanas a 0 ups *C. undecimalis* y *C. parallelus* prefieren catabolizar proteínas a diferencia de salinidades intermedias y marinas donde prefieren usar como sustrato catabólico proteínas y lípidos (Gracia-López *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2005). El uso preferente de proteína como sustratos catabólicos en salinidades cercanas a 0 ups se relaciona con el uso de aminoácidos como osmolitos intracelulares como consecuencia de la pérdida de iones en un ambiente hiposmótico en función al pez (Assem & Hanke, 1982; Lasserre & Gilles, 1971), esto provoca una pérdida excesiva de iones y genera una mayor canalización de energía al proceso de osmorregulación y no al crecimiento. En salinidades de ambientes marinos (35 ups), el género *Centropomus* prefieren usar proteínas y lípidos como sustratos catabólicos, como respuesta de un mayor costo en mantener un equilibrio en la concentración de osmolitos intracelulares en el proceso de osmorregulación en un ambiente hiperosmóticos en relación al pez (Gracia-López *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2005). Gracia-López *et al.* (2006) reportaron en *C. undecimalis* una menor inversión energética en el procesamiento del alimento en 12 ups respecto de 0, 25 y 35 ups. En salinidades intermedias el pez se encuentra en una condición isosmótica, en esta condición los peces canalizan la mayor parte de la energía en crecimiento (Woo & Kelly, 1995). Por otra parte, pocos son los estudios que se han dedicado en buscar fuentes de proteínas alternas a la harina de pescado para la formulación de balanceados en Centropómidos. Lemus *et al.* (2017) determinó a través de la digestibilidad *in vitro* e *in vivo*, que la harina de

subproductos avícolas y harina protiblen pueden ser utilizados como fuentes de proteína alterna en la formulación de balanceados en *C. undecimalis*. Silvãõ & Nunes (2017) sustituyó el 20% de la proteína utilizada en la formulación alimento balanceado para *C. undecimalis* con de harina de subproductos avícolas y obtuvieron una mejor tasa de crecimiento respecto de la dieta basal (1.57 vs 1.35%).

Conclusiones

La literatura existente sobre los requerimientos nutricionales en los Centropómidos que han sido seleccionados en el desarrollo de una tecnología acuícola es muy escasa en cada una de sus etapas (reproducción, cría larvaria y engorada). Sin embargo, los protocolos de reproducción y cría larvaria ya se han establecido. Por lo tanto, es importante atender los requerimientos nutricionales en la etapa de engorda, en *C. undecimalis* y *C. parrelelus* sólo se ha determinado el requerimiento de proteína dietética ($\geq 50\%$). No obstante, es necesario evaluar el uso de carbohidratos y lípidos como fuente de energía digestible con la finalidad de reducir el uso de proteína en la formulación de balanceados, así como buscar fuentes de proteína alternas a la harina de pescado. Por otra parte, es importante evaluar el uso de proteínas, lípidos y carbohidratos dietéticos en función de la condición de salinidad y no generalizar los requerimientos nutricionales.

Bibliografía

- Aliaume, C., Zerbi, A., & Miller, J. M. (1997). Nursery habitat and diet of juvenile *Centropomus* species in Puerto Rico estuaries. *Gulf of Mexico Science*, 15(2), 77–87.
- Aliaume, Catherine, Zerbi, A., Joyeux, J. C., & Miller, J. M. (2000). Growth of juvenile *Centropomus undecimalis* in a tropical island. *Environmental Biology of Fishes*, 59(3), 299–308.
- Alvarez-Lajonchère, L., Cerqueira, V. R., & Reis, M. (2002). Embryonic and fish larval developmental stages of the fat snook *Centropomus parallelus* Poey (Pisces, Centropomidae), whit interest for aquaculture. *Hidrobiológica*, 12(2), 89–100.
- Alvarez-Lajonchère, L., & Tsuzuki, M. Y. (2008). A review of methods for *Centropomus* spp. (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. *Aquaculture Research*, 39, 684–700.
- Alvarez-Lajonchère, Luis, & Ibarra-Castro, L. (2013). Aquaculture species selection method applied to marine fish in the Caribbean. *Aquaculture*, 408–409, 20–29.
- Alvarez-Lajoncherei, L., Cerqueira, V. R., Silva, I. D., Araujo, J., & Reis, M. (2002). Mass Production of Juveniles of the Fat Snook *Centropomus parallelus* in Brazil. *Journal of the World Aquaculture Society*, 33(4).
- Alvarez-Lajonchère, L., & Taylor, R. G. (2003). Economies of scale for juvenile production of common snook (*Centropomus undecimalis* Bloch). *Aquaculture Economics and Management*, 7(5–6), 273–292.
- Andrade, H., Santos, J., & Taylor, R. (2013). Life-history traits of the common snook *Centropomus undecimalis* in a Caribbean estuary and large-scale biogeographic patterns relevant to management. *Journal of Fish Biology*, 82(6), 1951–1974.
- Assem, H., & Hanke, W. (1982). The significance of the amino acids during osmotic adjustment in teleost fish- i. Changes in the euryhaline *Sarotherodon mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 74A(3), 531–536.
- Ávila, J. P., Sansores, A. C., & Ceballos, R. P. (2004). Diagnóstico de la calidad del agua subterránea en los sistemas municipales de abastecimiento en el Estado de Yucatán . *Ingeniería*, 165–179.
- Blewett, D. A., Hensley, R. A., & Stevens, P. W. (2006). Feeding habits of common snook, *Centropomus undecimalis*, in Charlotte Harbor, Florida. *Gulf and Caribbean Research*, 18, 1–13.
- Bœuf, G., & Payan, P. (2001). How should salinity influence fish growth ? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 130, 411–423.
- Caballero-Chávez, V. (2012). Evaluación de la pesquería de robalo blanco *Centropomus undecimalis* en Ciudad del Carmen, Campeche. *Ciencia Pesquera*, 20(2), 35–42.
- Carvalho, C. V. A., Passini, G., Costa, W. E., & Cerqueira, V. R. (2014). Feminization and growth of juvenile fat snook *Centropomus parallelus* fed diets with different concentrations of estradiol-17 β . *Aquaculture International*, 22(4), 1391–1401.

- Cerqueira, V. R., & Tsuzuki, M. Y. (2009). A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1), 17–28.
- Concha-Frías, B., Álvarez-González, C. A., Gaxiola, G., Chiappa, X., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., & Cruz-Alvarado, F. J. (2018). Dietary protein requirement in common snook (*Centropomus undecimalis*) juveniles reared in marine and brackish water. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5(13), 45–54.
- Contente, R. F., Stefanoni, M. F., & Gadig, O. B. F. (2009). Size-related shifts in dietary composition of *Centropomus parallelus* (Perciformes: Centropomidae) in an estuarine ecosystem of the southeastern coast of Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*, 25(3), 335–342.
- Cruz-Botto, S., Roca-Lanao, B., Gaitán-Ibarra, S., Chaparro-Muñoz, N., & Villamizar, N. (2018). Natural vs laboratory conditions on the reproductive biology of common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). *Aquaculture*, 482, 9–16.
- Dutka-Gianelli, J. (2014). Feeding Habits of the Smallscale Fat Snook from East-Central Florida. *Transactions of the American Fisheries Society*, 143(5), 1199–1203.
- FAO. (2018). *The state of fisheries and aquaculture in the world 2018*. Roma: Meeting the sustainable development goals. <https://doi.org/issn 10>
- Flores-Ortega, J. R., González-Sansón, G., Aguilar-Betancourt, C., Kosonoy-Aceves, D., Venegas-Muñoz, A., Lucano-Ramírez, G., & Ruiz-Ramírez, S. (2015). Feeding habits of juvenile *Centropomus robalito* (Centropomidae: Actinopterygii) in Barra de Navidad lagoon, Mexican Central Pacific. *Revista de Biología Tropical*, 63(4), 1071.
- Freitas, M. O., & Abilhoa, V. (2017). Reproductive biology of the tarpon snook *Centropomus pectinatus* (Perciformes, Centropomidae) in estuarine waters in the south-western Atlantic. *Journal of Fish Biology*, 91(2), 686–694.
- Fyhn, H. J. (1989). First feeding of marine fish larvae: Are free amino acids the source of energy? *Aquaculture*, 80(1–2), 111–120.
- Gassman, J., Rojas, H. L., & Padrón, D. (2016). Reproducción de los róbalos *Centropomus undecimalis* y *C. ensiferus* (Perciformes: Centropomidae) en una laguna costera tropical. *Revista de Biología Tropical*, 65(March), 181–194.
- Gilmore, R. ., Billock, L. H., & Berry, F. H. (1978). Hypothermal mortality in marine fishes of south-central Florida january, 1977. *Northeast Gulf Science*, 2(2), 77–97.
- Gilmore, R. G., Donohoe, C. J., & Cooke, D. W. (1983). Observations on the distribution and biology of east-central Florida populations of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Florida Scientist*, 46(3–4), 306–313.
- Gracia-López, V., García-Galano, T., Gaxiola-Córtes, G., & Pacheco-Campos, J. (2003). Effect of dietary protein level and commercial feeds on growth and feeding of juvenile common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). *Ciencias Marinas*, 29(4B), 585–594.

- Gracia-López, V., Rosas-Vázquez, C., & Brito-Pérez, R. (2006). Effects of salinity on physiological conditions in juvenile common snook *Centropomus undecimalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 145(3), 340–345.
- Houde, E. D. (1975). Effects of stocking density and food density on survival, growth and yield of laboratory-reared larvae of sea bream *Archosargus rhomboidalis* (L.) (Sparidae). *Journal of Fish Biology*, 7(1), 115–127.
- Ibarra-Castro, L., Alvarez-Lajonchère, L., Rosas, C., Palomino-Albarrán, I. G., Holt, G. J., & Sanchez-Zamora, A. (2011). GnRHa-induced spawning with natural fertilization and pilot-scale juvenile mass production of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). *Aquaculture*, 319(3–4), 479–483.
- Ibarra-Castro, L., Navarro-Flores, J., Sánchez-Téllez, J. L., Martínez-Brown, J. M., Ochoa-Bojórquez, L. A., & Rojo-Cebreros, Á. H. (2017). Hatchery production of pacific white snook at CIAD-unit Mazatlan, Mexico. *World Aquaculture*, 25–29.
- Jimenez-Martinez, L. D., Alvarez-González, C. A., Tovar-Ramírez, D., Gaxiola, G., Sanchez-Zamora, A., Moyano, F. J., ... Palomino-Albarrán, I. G. (2012). Digestive enzyme activities during early ontogeny in common snook (*Centropomus Undecimalis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(2), 441–454.
- Lasserre, P., & Gilles, R. (1971). Modification of the amino acid pool in the parietal muscle of two euryhaline teleosts during osmotic adjustment. *Experientia*, 27, 1434–1435.
- Leger, P., Bengtson, D. A., Simpson, K. L., & Sorgeloos, P. (1986). The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr.Mar.Biol.Ann.Rev.*
- Lemus, I., Maldonado, C., Cuzon, G., Sanchez, A., Gaxiola, G., Alvarez, A., & Guerrero, M. (2017). In vitro and in vivo feedstuff digestibility for snook, *Centropomus undecimalis*, juveniles. *Journal of the World Aquaculture Society*, 49(1), 205–215.
- Lorán-Núñez, R. M., Martínez-isunza, F. R., Valdez-guzmán, A. J., Garduño-dionate, M., & Rolando, E. (2012). Reproducción y madurez sexual de robalo prieto (*Centropomus poeyi*) y robalo blanco (*C. undecimalis*) en el Sistema Lagunar de Alvarado, Veracruz (2005-2007). *Ciencia Pesquera*, 20(1), 49–64.
- Maldonado-García, M., Gracia-López, V., Carrillo, M., Hernández-Herrera, A., & Rodríguez-Jaramillo, C. (2005). Stages of gonad development during the reproductive cycle of the blackfin snook, *Centropomus medius* Günther. *Aquaculture Research*, 36(6), 554–563. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01253.x>
- McMichael, R. H., Peters, G. R., & Parsons, G. R. (1989). Early life history of the snook *Centropomus*, in Tampa Bay, Florida. *Northeast Gulf Science*, 10(2), 113–125.
- Michelotti, B. T., Passini, G., Carvalho, C., Salbego, J., Mori, N. C., Rodrigues, R. V., ... Cerqueira, V. R. (2018). Growth and metabolic parameters of common snook juveniles raised in freshwater with different water hardness. *Aquaculture*, 482, 31–35. Retrieved from

- Motta, F. S., Mendonça, J. T., & Moro, P. S. (2016). Collaborative assessment of recreational fishing in a subtropical estuarine system: a case study with fishing guides from south-eastern Brazil. *Fisheries Management and Ecology*, 23(3–4), 291–302.
- Muller, R. G., & Taylor, R. G. (2012). *The 2012 stock assessment update of common snook, Centropomus undecimalis*. St. Petersburg, Florida, USA.
- Mylonas, C. C., Magnus, Y., Klebanov, Y., Gissis, A., & Zohar, Y. (1997). Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass. *Journal of Fish Biology*, 51(2), 234–250.
- Mylonas, Constantinos C., & Zohar, Y. (2000). Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10(4), 463–491.
- Nonell, J. G. (1995). Growth of pacific snook (*Centropomus nigrescens*) juveniles at different salinities. *Unicencia*, 12, 35–38.
- Passini, G., Carvalho, C. V. A., Sterzelecki, F. C., & Cerqueira, V. R. (2016). Induction of sex inversion in common snook (*Centropomus undecimalis*) males, using 17- β oestradiol implants. *Aquaculture Research*, 47(4), 1090–1099.
- Perera-García, M. A., Mendoza-Carranza, M., Contreras-Sánchez, W. M., Huerta-Ortíz, M., & Pérez-Sánchez, E. (2011). Reproductive biology of common snook *Centropomus undecimalis* (Perciformes: Centropomidae) in two tropical habitats. *Revista de Biología Tropical*, 59(2), 669–681.
- Peters, K. M., Matheson, J. R. E., & Taylor, R. G. (1998). Reproduction and early life history of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), in Florida. *Bulletin of Marine Science*, 62(2), 509–529.
- Rivas, L. R. (1986). Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia*, 3, 579–611.
- Rocha, D. S., Gomes, A. J., Ngan, V. V., Passos, M. J. A. C. R., & Furia, R. R. (2005). Metabolic demand and growth of juveniles of *Centropomus parallelus* as function of salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 316(2), 157–165.
- Sargent, J. R., McEvoy, L. A., & Bell, J. G. (1997). Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155(1–4), 117–127.
- Scott, D. P. (1962). Effect of food quantity on fecundity of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 9(1955), 715–731.
- Silvão, C. F., & Nunes, A. J. P. (2017). Effect of dietary amino acid composition from proteins alternative to fishmeal on the growth of juveniles of the common snook, *Centropomus undecimalis*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(7), 569–575.
- Soligo, T. A., Garcia, A. S., & Cerqueira, V. R. (2011). Weaning of the common snook (*Centropomus undecimalis*) early juveniles reared in laboratory using commercial and experimental diets. *Boletim Do Instituto de Pesca, São Paulo, Brasil*, 37(4), 367–374.
- Souza, J. H., Machado, F. D., Sachsida, G. A., Furtado, R. F., & Tsuzuki, M. Y. (2011). Desempenho zootécnico e econômico de juvenis de robalo-peva alimentados com dietas contendo diferentes concentrações proteicas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2(1), 190–195.

- Suárez-Bautista, J., & Rodríguez-Forero, A. (2015). Ionregulation in juvenile swordspine snook (*Centropomus ensiferus*, Poey, 1860) in relation to environmental salinity. *Journal of Applied Ichthyology*, 31(5), 900–904.
- Taylor, G. R., Whittington, J. A., Grier, H. J., & Crabtree, R. E. (2000). Age, growth, maturation, and protandric sex reversal in common snook, *Centropomus undecimalis*, from the east and west coasts of South Florida. *Fishery Bulletin*, 98, 612–624.
- Taylor, R. G., Grier, H. J., & Whittington, J. A. (1998). Spawning rhythms of common snook in Florida. *Journal of Fish Biology*, 53, 502–520.
- Tonini, W. C. T., Braga, L. G., & Vila-Nova, D. L. D. (2004). Dieta de juvenis do robalo *Centropomus parallelus* Poey, 1860 no sul da bahia, Brasil. *Boletim Do Instituto de Pesca*, 33(1), 85–91.
- Tsuzuki, M. Y., Sugai, J. K., Cesar, J., Francisco, C. J., & Cerqueira, V. R. (2007). Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. *Aquaculture*, 271, 319–325.
- Tucker, J. W. (1987). Snook culture. *American Fisheries Society Symposium*, 46, 297–30.
- Tucker, J.J.W. (1987). Snook and tarpon snook culture and preliminary evaluation for comercial farming. *The Progresive Fish-Culturist*, 49, 49–57.
- Tucker, JR.J.W., Matthew, P., Landau, P., & Faulkner, B. E. (1985). Culinary value and composition af wild and captive common snook, *Centropomus undecimalis*. *Florida Scientist*, 49, 196–200.
- Vidal-López, J. M., Álvarez-gonzález, C. A., & Contreras-, W. M. (2012). Feminization of young common Snook *Centropomus undecimalis* (Bloch 1792) using 17 β -estradiol. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*, 4, 83–93.
- Vidal-López, J. M., Contreras-sánchez, W. M., Hernández-Franyutti, A. A., Carmen-, M. Del, Manuel, J., Contreras-Sánchez, W. M., & Torres-, A. (2019). Early gonadal differentiation in the Mexican snook *Centropomus poeyi* (Centropomidae, Perciformes , Teleostei) suggests protandric hermaphroditism. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 51(6), 327–345.
- Vidal Lopez, J., Contreras Sanchez, W., Hernandez Franyutti, A., Contreras Garcia, M., & Uribe Aranzabal, M. (2019). Functional feminization of the Mexican snook (*Centropomus poeyi*) using 17 β estradiol in the diet. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(2), 240–250.
- Woo, N. Y. S., & Kelly, S. P. (1995). Effects of salinity and nutritional status on growth and metabolism of *Sparus sarba* in a closed seawater system. *Aquaculture*, 135(95), 229–238.

Enfoque Sustentable en la Engorda de Tilapia del Nilo Alimentadas con Harina de Biofloc: una Revisión

¹Adriana Ferreira da Silva, ¹Adriana Carolina Carrillo Pat, ²Juan Carlos Maldonado Flores, ¹Magnolia Tzec-Gamboa, ³Francisco J Solorio Sánchez

¹Universidad Autónoma de Yucatán, Campos de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Biología Marina, Carretera
Mérida-Xmatkuil Km. 15.5 Mérida Yucatán México CP 97100

²Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación – UNAM, Sisal, Yucatán, Puerto de Abrigo S/N, UNAM, 97355 Sisal, Yuc

³Universidad Autónoma de Yucatán, Campos de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de nutrición Carretera
Mérida-Xmatkuil Km. 15.5 Mérida Yucatán México CP 97100

adriana.dasilva@correo.uady.mx, adycarrillo123@hotmail.com, carlos_maldonado@ciencias.unam.mx, ssolorio@correo.uady.mx, magnolia.tzec@correo.uady.mx

Resumen

El lanzamiento de nuevos e innovadores productos alimenticios para la industria acuícola, ha sido incesante. El apareamiento de dietas especiales para diferentes sistemas de producción, dietas funcionales, dietas de alta energía, dietas que minimizan problemas sanitarios son ejemplos de cómo se han revolucionado el sector acuícola. Los sistemas convencionales de producción se caracterizan principalmente por la necesidad de grandes cantidades de agua, aumento de la contaminación de los afluentes de descarga, y otros factores ambientales adversos. La búsqueda de nuevas posibilidades de producción que sean amigables con el ambiente, incluyentes socialmente y rentables, son cada vez más indispensables. Por su perfil sostenible, la tecnología biofloc (BFT) gana cada vez más espacio, principalmente en lugares donde la escasez de agua es una limitante. Producir más con menor volumen de agua, y al menor costo ambiental posible, es el objetivo de esta tecnología. Adicionalmente, ayuda a reducir los costos de producción, principalmente los relacionados con la alimentación. Se analiza en esta revisión la información sobre los avances relacionados con los diferentes usos de la harina de biofloc para el cultivo de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*).

Palabras clave: tecnología biofloc, tilapia, nutrición, medio ambiente

Introducción

La harina de pescado, por alta calidad nutricional y palatabilidad, es una de las fuentes de proteína más demandadas en la industria de producción acuícola. Sin embargo, la creciente demanda de harina de pescado, impulsada por el crecimiento continuo de la acuicultura en respuesta a la expansión del mercado de productos pesqueros, así como la inestabilidad de los suministros, han llevado a un aumento considerable en el precio de esta fuente de proteínas en los últimos años (FAO, 2016). Para garantizar la sostenibilidad económica, del medio ambiente y controlar los costos, es necesario desarrollar nuevas tecnologías, que incluyan fuentes alternativas de proteínas para la alimentación de la acuicultura (Kuhn *et al.*, 2010; Gasco *et al.*, 2018).

En México, la producción de tilapia aumentó significativamente en los últimos años (CONAPESCA, 2018). Sin embargo, la creciente actividad, así como su intensificación, requieren una mayor cantidad de insumos y materias primas. Por lo tanto, encontrar fuentes alternativas de proteínas para el reemplazo parcial o total de la harina de pescado en los alimentos para tilapias se ha convertido en una parte fundamental de la investigación sobre la producción y el suministro de dietas comerciales económicamente viables (Poot y Gasca 2016, Silva 2019).

El lanzamiento de nuevos e innovadores productos alimenticios para la industria acuícola, ha sido incesante. El surgimiento de dietas especiales para diferentes sistemas de producción, dietas funcionales, dietas de alta energía (salmón y trucha), dietas que minimizan problemas sanitarios, son algunos de los ejemplos de cómo se ha revolucionado el sector. Sin embargo, la posibilidad de formular dietas sin dependencia de ingredientes de origen marino, sin lugar a duda fue un parteaguas para la nutrición acuícola (Silva, 2018).

Varios estudios han evaluado el potencial para el reemplazo de la harina de pescado con otros subproductos animales o vegetales en dietas para tilapia (Furuya *et al.*, 2001, Pezzato *et al.*, 2002, Sklan *et al.*, 2004, Olvera- Novoa *et al.*, 2006, 2008, Poot *et al.*, 2012). El uso de proteína de origen vegetal en lugar de harina de pescado en algunos alimentos para la acuicultura ha sido todo un éxito. Sin embargo, factores anti nutricionales, baja palatabilidad

y deficiencia de aminoácidos y ácidos grasos esenciales pueden limitar su utilización en dietas. La investigación sobre los ingredientes potenciales de origen microbiano ha sido escasa hasta ahora.

Algunas investigaciones han demostrado el potencial de la harina de biofloc como sustituto de la harina de pescado en dietas (Bossier y Ekasari, 2017, Prabu *et al.*, 2017, Prabu *et al.*, 2018, Silva 2019). Esta harina microbiana, formada en ambientes de cría súper intensiva de peces y camarones puede proporcionar proteínas y otros nutrientes en la alimentación de diversos grupos de animales (Kuhn *et al.*, 2010, Dantas Jr *et al.*, 2014).

Los flóculos microbianos o simplemente biofloc, se desarrollan para evitar o anular el cambio de agua en los sistemas de cultivo súper intensivos por acción de bacterias que actúan en la mejora de la calidad del agua y por la unión de algas, hongos, pequeños invertebrados, materia orgánica y partículas inorgánicas. Posee un contenido de proteína bruta que varía entre 24 y 40%, 1 a 7% de lípidos totales, representando una fuente más de alimento, simultáneamente con el alimento ofertado. Estas y otras características tornan la harina de biofloc una fuente potencia para sustituir parcial o totalmente la harina de pescado en la industria de producción de tilapia (Silva 2019, Jatobá *et al.*, 2019).

Esta revisión pretende analizar la información sobre los avances relacionados con los diferentes usos de la harina de biofloc para el cultivo de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*).

Historia del BFT

Los precursores

Los primeros trabajos con la tecnología biofloc (BFT), iniciaron a finales de los 70's en Tahití con los investigadores de COP/IFREMER en conjunto con Ralston Purina de EE.UU. Los primeros resultados de estas investigaciones fueron en las especies de camarones *L. vannamei* y *F. stilirostrys* donde obtuvieron rendimientos de 2.3 Kg/m² con densidades de 108 camarones/m² y tasas de 10 % de recambio durante todo el proceso de engorda (Gaxiola y Cuzon 2015). Otro trabajo clave en los estudios del BFT fue el de Azam *et al.*, 1983, en el

que se hace un acercamiento al papel y la dinámica que cumplen los microorganismos en un sistema acuático natural.

Los investigadores plantearon el aprovechamiento por el “microcosmos acuático”, también en este documento se comprobó que las bacterias fijan carbono como fuente de energía y que aprovechan el nitrógeno para la síntesis de proteínas; bajo este supuesto el denominado ‘microbial loop’, término acuñado en el artículo en cuestión, incluye el papel desempeñado por las bacterias en relación con el carbono y los ciclos de nutrientes (Collazos-Lasso y Arias-Castellanos, 2015).

En los 90’s la producción acuícola mundial sufrió un colapso, en diversos países se identificaron enfermedades relacionadas principalmente con bacterias y virus, este último fue el protagonista de una de las mayores crisis del sector camaronícola. Hoy se sabe que el mal manejo (del agua y alimento principalmente) fueron la causa de este colapso. Así que, en diversos países se empezaron a desarrollar técnicas para minimizar la mortalidad de los organismos cultivados (Silva, 2017).

En este período, en Israel, el Dr. Avnimelech y colaboradores, publicarán artículos abordando temas como la producción con mínimo o cero recambios de agua a través de la manipulación de microorganismos utilizando fuentes de carbono (azúcares simples) para degradación del nitrógeno en sistemas de producción, siendo la tilapia su principal modelo biológico.

Paralelamente en Estados Unidos, el Dr. Hopkins y colaboradores (Waddell Mariculture Center, Bluffton, Carolina del Sur, EUA), buscaban contrarrestar los problemas con el mejor uso del agua de cultivo (mínimo o cero recambios) y además de utilizar los flóculos bacterianos como fuente de alimento adicional, mejorando los índices zootécnicos y consecuentemente reduciendo gastos en la producción. El modelo biológico principal estudiado por ese equipo de investigadores fue el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Hoy casi 30 años después son considerados los principales trabajos relacionados a la temática del biofloc.

Biofloc en América latina

En mediados de los años 2000, en Brasil, el Dr. Wasielesky y su equipo de trabajo (Universidad Federal de Rio Grande, Estação Marinha de Aquicultura) encabezaron las investigaciones con la tecnología biofloc en América Latina. Wasielesky y su equipo, fueron pioneros en Brasil con el BFT, empezaron a investigar a fondo la tecnología, adaptando la misma a las características locales. El modelo biológico principal estudiado por el equipo de Wasielesky fue y es el camarón blanco (Silva, 2017). En México, el equipo de la Dra. Gabriela Gaxiola, en la UNAM, Campus Sisal Yucatán, trabajan con la línea de investigación del BFT, donde sus trabajos se centran en el uso del BFT en la engorda y reproducción de diferentes especies de camarones marinos.

Formación de agregados microbianos y ruta de los compuestos nitrogenados en cultivos biofloc

La BFT está formada por partículas orgánicas disueltas en el agua o adheridas al estanque. Estas partículas engloban material orgánico particulado (residuo de alimento, heces del organismo, mucus de los peces), donde se desarrollan organismos microscópicos diversos como microalgas, hongos, protozoarios, rotíferos, copépodos, ciliados, flagelados, nematodos y en especial una gran diversidad de bacterias heterotróficas (figura 1) (Silva 2019).

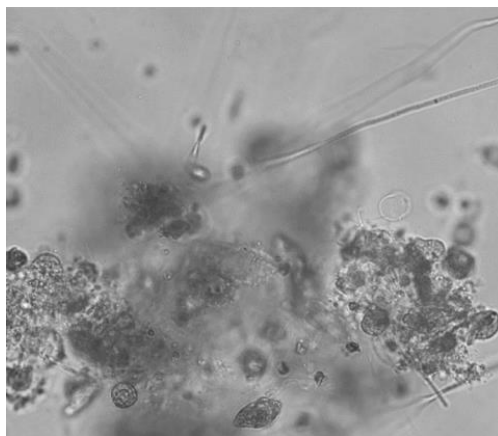


Figura 1. floc microbiano con diatomeas, dinoflagelados y cianobacterias.

Foto: Leandro Cesar de Godoy

Las bacterias desempeñan un importante papel en los sistemas acuícolas, haciendo imprescindible una comprensión adecuada de las diferencias y funciones entre bacterias heterotróficas y autotróficas para el diseño y manejo de muchas operaciones. Las bacterias heterotróficas se especializan en la transformación de materia orgánica. Estos organismos convierten el carbono orgánico disuelto en carbono particulado, haciéndolo potencialmente disponible para niveles tróficos superiores. A diferencia de las heterotróficas, las bacterias autotróficas obtienen energía a partir de la luz (fotoautotróficas) y de la oxidación de compuestos inorgánicos, tales como el amoníaco (quimioautotróficos) (Manan *et al.*, 2017).

El ecosistema microbiano en ambientes acuícolas es generalmente dominado por organismos heterotróficos compitiendo por sustratos orgánicos, como fuentes de carbono y energía (azúcar, almidón y celulosa). Sin embargo, los sistemas de cultivo autotrófico y heterotrófico son complementarios (Avnimelech, 1999, Azim *et al.*, 2008).

Las bacterias heterotróficas producen dióxido de carbono (CO₂) como producto final de su metabolismo, el cual provee una fuente de carbono para las autotróficas que, al crecer, producen biomasa que será consumida eventualmente por las heterotróficas. Uno de los mayores problemas de calidad del agua en sistemas acuícolas intensivos es la acumulación de formas tóxicas de nitrógeno inorgánico en el agua (amonio, nitrito y nitrato). Para que esto no ocurra, han sido estudiadas y adoptadas técnicas de manejo en las últimas décadas para el mejor funcionamiento del sistema, como por ejemplo la relación C: N ideal para el desarrollo de las comunidades microbianas (Avnimelech, 2007).

Varios procesos microbianos pueden ser utilizados para reducir los niveles de amoníaco y nitrito en los ambientes de cultivo (Avnimelech, 2007). Estos procesos incluyen la nitrificación, la denitrificación, la mineralización, fotosíntesis y el crecimiento de bacterias heterotróficas (Avnimelech, 2009).

Los microorganismos nitrificantes son responsables de la oxidación del amoníaco hacia nitrito y, posteriormente, hacia nitrato. Estos son principalmente autótrofos obligatorios, que consumen dióxido de carbono como fuente primaria de carbono, y aeróbicos obligatorios, pues requieren oxígeno para crecer (Da Silva *et al.*, 2013).

La conversión biológica del amoníaco en nitrito es desarrollada por bacterias que oxidan el amoníaco – bacterias amonio oxidantes (AOB), que incluyen bacterias del género *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus*, y *Nitrosovibrio*; y la subsiguiente oxidación, del nitrito a nitrato, es realizada por bacterias que oxidan el nitrito – (Nitrito-Oxidantes NOB), que son del género *Nitrobacter*, *Nitrococcus* y *Nitrospina*, esas últimas tienen un crecimiento lento comparado con las AOB, llevando a una acumulación de nitrito en el sistema (Avnimelech, 2009, Da Silva *et al.*, 2013).

Las bacterias heterotróficas no requieren ser introducidas pues aparecen de forma natural a través de esporas repartidas en el aire o en los propios cuerpos de los animales o superficies de los materiales introducidos. Aparecen si existe en el sistema algún residuo orgánico del que alimentarse. Las colonias de bacterias heterotróficas se desarrollan a gran velocidad por simple división. El proceso heterotrófico se basa en la remoción del nitrógeno amoniacal y su reincorporación en biomasa bacteriana, pudiendo ser mejorado por la adición de carbono en la forma de carbohidrato. La fuente de carbohidrato más popular es la melaza de caña de azúcar en la proporción de 12:1 (C: N – carbono: nitrógeno) (Da Silva *et al.*, 2013).

En cuanto al nitrato, éste puede ser convertido en gas nitrógeno a través de la acción de bacterias denitrificadoras y volatilizadas a la atmósfera. La denitrificación representa la forma de mayor pérdida de nitrógeno de los estanques. Los principales factores que influyen en la tasa de nitrificación son las concentraciones de amoníaco y nitrito, la relación carbono / nitrógeno, el oxígeno disuelto, el pH, la temperatura y la alcalinidad (Avnimelech, 1999, Azim *et al.*, 2008, Da Silva *et al.*, 2013).

Composición microbiana y su aporte nutrimental

Los bioflocs son agregados (flocs) de algas, bacterias, protozoos y otros tipos de materia orgánica en partículas, como heces y residuos de alimentos. Cada flóculo se mantiene unido en una matriz suelta de moco que es secretada por bacterias, unida por microorganismos filamentosos, o mediante atracción electrostática. La comunidad biofloc también incluye organismos que son herbívoros de flóculos, como algún zooplancton (rotíferos, copépodos) y nematodos. En donde las bacterias heterotróficas son quizás las más importantes del

sistema, son las que transforman los residuos nitrogenados de las especies cultivadas en biomasa bacteriana y llevar a cabo así el reciclaje de nutrientes manteniendo así una buena calidad del agua y proporcionando una fuente de alimento.

Además, las bacterias heterotróficas inhiben la proliferación de patógenos, incluso, algunas de estas bacterias tienen un efecto probiótico (*Bacillus spp.*) que beneficia en el crecimiento y desarrollo de las especies a cultivar (Ferreira *et al.*, 2015; Pérez-Fuentes *et al.*, 2018)

El interés en acuicultura de tener un biofloc microbiano, es porque nos proporciona un valor agregado, además de las ventajas mencionadas anteriormente, nos proporciona un medio rico en nutrientes fácilmente digeribles por las especies a cultivar y contiene además productos ricos en energía (poly- β -hydroxybutyrate), producto del metabolismo de las bacterias.

Entre los parámetros fisicoquímicos utilizados para evaluar la comunidad microbiana en los flocs son el contenido de proteína, la determinación de ácidos grasos, y la medición de poly- β -hydroxybutyrate. Para la identificación de especies de interés, se utilizan técnicas moleculares (FISH, PCR, DGGE), con la finalidad de evaluar la madurez y estabilidad de la comunidad microbiana (De Schryver *et al.*, 2008). Sin embargo, la composición y abundancia de la comunidad bacteriana se ve afectada por las condiciones ambientales presentes en los cultivos de biofloc. Algunos factores que influyen son las especies en cultivo, calidad del agua, nutrientes, pero principalmente la relación C:N tiene un importante impacto en el desarrollo bacteriano (bacterias suspendidas y bacterias unidas al sustrato) (Yu *et al.*, 2016). La utilización de una fuente de carbono en particular podría afectar la composición nutricional de biofloc, la morfoestructura de biofloc y la comunidad microbiana de biofloc (Wei, *et al.*, 2016).

Con lo que respecta al valor nutricional del biofloc, el contenido de proteína en peso seco de biofloc varía del 25 al 50 por ciento, generalmente entre 30 y 45 por ciento, contenido de grasa de 0.5 a 15 por ciento, con la mayoría de las estimaciones entre 1 y 5 por ciento. A pesar que en estudios realizados indican que es deficiente en aminoácidos metionina y lisina, los bioflocs son buenas fuentes de vitaminas y minerales, especialmente fósforo (Hargreaves, 2013; Pérez-Fuentes *et al.*, 2018). Debido a su calidad nutricional, se ha propuesto biofloc

seco como ingrediente para reemplazar harina de pescado o harina de soya en alimentos acuícolas. En dietas formuladas a base de harina de biofloc (hasta un 30 por ciento de biofloc seco) para alimentar camarones arrojaron resultados prometedores. Sin embargo, una limitante para utilizar el biofloc seco es que las cantidades disponibles son limitadas, además que la rentabilidad de producir y secar sólidos de biofloc en una escala comercial es cuestionable (Hargreaves, 2013).

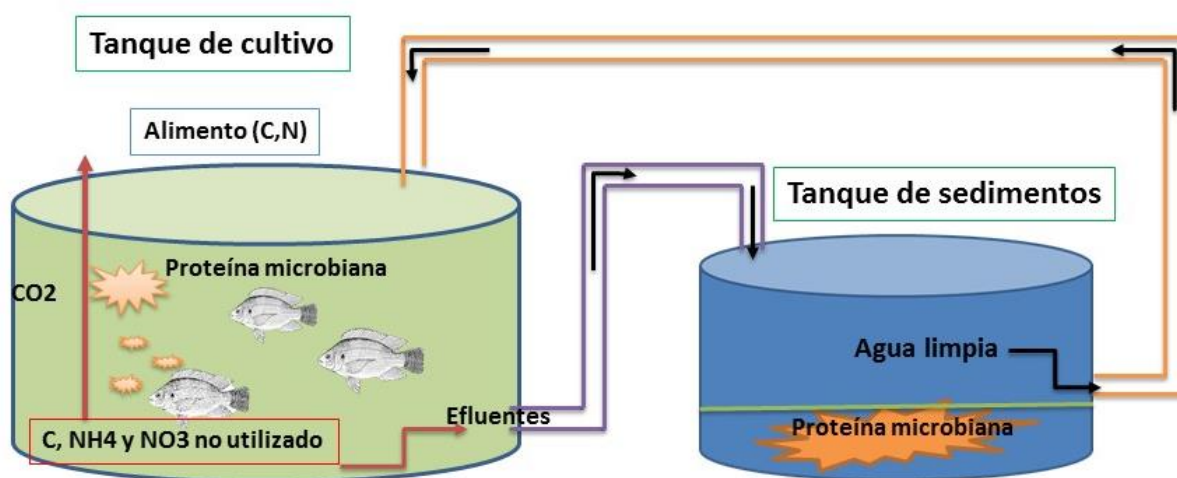
Desarrollo de tilapia en cultivos con biofloc

El uso eficiente del agua dulce en los sistemas de alimentación es una necesidad urgente ante el impacto del cambio climático sobre los sistemas de producción de alimentos. En este sentido, se deben desarrollar, promover y adoptar estrategias orientadas a la conservación y aprovechamiento eficiente del agua dulce en la producción de tilapia diferentes a las técnicas tradicionales. La intensificación sostenible es una de las metas principales en el desarrollo de la acuacultura.

El uso del biofloc es una tecnología que ha venido presentando grandes ventajas en comparación a las tecnologías tradicionales. Una de las principales ventajas está relacionada con la poca cantidad de agua que se requiere y con poco impacto ambiental, mayor reciclaje de nitrógeno, síntesis de biomasa bacteriana y el suministro de alimento altamente nutritivo (Lima *et al.*, 2018). Con relación al consumo de agua por kg de tilapia producida es de 0.071 m³ (Perez-Fuentes *et al.*, 2016), mientras que con la técnica de producción de acuacultura tradicional se utilizan en promedio unos 17 m³ de agua/kg de producción (Gallardo-Colli *et al.*, 2019), aún el consumo de agua es menor cuando se recicla o reúsa varias veces dentro del mismo sistema de producción. En este sentido una ventaja adicional es que en condiciones de biofloc utilizando agua de reúso y bajo un esquema de producción intensivo se pueden obtener resultados similares a los obtenidos con biofloc sin reúso de agua (Gallardo-Colli *et al.*, 2019). Estos autores reportan pesos finales de 163 gr y 159 gr para peces producidos con biofloc y usando biofloc y agua de reúso respectivamente.

Otro aspecto relevante en la producción de tilapia con biofloc está relacionado con el consumo de proteína microbiana mejorando la conversión alimenticia, incluyendo actividad enzimática y hematológica e inmunológica de los peces (Long *et al.*, 2015).

Se obtiene resultados altamente satisfactorios en la producción de alevines de tilapia en sistema de biofloc. Estudios realizados por Lovera *et al.*, (2017) concluyen que los alevines producidos bajo condiciones de diferentes relaciones de C:N pueden alcanzar un crecimiento rápido de entre 20-22 gr.



Prototipo de biofloc para la producción de tilapia. Modificado de: Suloma et al., 2015.

La harina de biofloc como alimento para peces

Una problemática que los acuicultores han tenido que hacer frente es a la disyuntiva de producir sus propios alimentos, ante lo cual también confrontan diversos problemas. En algunos casos los acuicultores optan por las proteínas vegetales que minimizan el costo del insumo y mejoran la producción general. En los últimos años, se han resaltado diversas hojas, frutos y semillas como excelentes complementos que brindan resultados muy positivos en los cultivos de especies piscícolas (Arcienegas 2014, y Toledo-Pérez 2000).

Sin embargo, esa aparente alta disponibilidad de alimentos de origen vegetal para alimento de animales, principalmente leguminosas, con un buen contenido y balance de proteína y

energía, no pueden ser utilizados en todo su potencial por el efecto limitante que imponen los denominados factores antinutricionales (FAN) (Acuña *et al.*, 2009).

La acción de los FAN no sólo consiste en interferir con el aprovechamiento de los nutrientes, sino que en varios casos promueve pérdidas importantes de proteína endógena y en algunos casos produce daños al organismo del animal que los consume. En la alimentación convencional de animales y desde una perspectiva puramente biológica, se ha señalado que el desperdicio de proteína potencialmente utilizable que produce su uso atenta contra la sustentabilidad de la producción debido a las considerables pérdidas de N y en consecuencia, al negativo impacto ambiental que causan los desechos animales. Sin embargo, debiera considerarse que este fenómeno tiene su origen en la intensidad del modelo de producción al que se les pretende incorporar y sólo en una menor proporción, en su cualidad natural (Acuña *et al.*, 2009).

Para resolver la problemática alimenticia en cultivos de tilapia del Nilo, se han desarrollado diferentes alternativas para complementar la alimentación de los ejemplares de dicho cultivo. Investigando acerca de la flexibilidad alimenticia de la especie, se ha observado que microalgas, coloides, zooplancton, polímeros orgánicos, cationes y células muertas son consumidas en especies cultivadas como una buena fuente proteínica con la capacidad de reducir los costos alimenticios en un 25%. (Avnilmelech 2006; De Schryver *et al.*, 2008; Ekasari *et al.*, 2010).

Sin embargo; en la producción de tilapia, los recambios de agua son constantes debido a la acumulación de material sólido disuelto en el agua, puesto que este, puede ser causa de enfermedades y mala salud de los organismos. Al hacer estos recambios, se eliminan materiales orgánicos y cuerpos en suspensión sin posibilidad de que los organismos dentro del cultivo puedan alimentarse. Otra problemática frecuente son los bajos niveles de oxígeno o los altos niveles de nitritos, nitratos y amoníaco que pueden presentarse en determinado momento. Estos niveles son dependientes de los números de recambios, densidades, factores ambientales y medidas de sanidad implementados en la producción. Además, la incidencia de enfermedades representa una potencial amenaza a la producción y rentabilidad de un cultivo y es por esto por lo que, en los últimos años, se han buscado alternativas con el fin de

mejorar las condiciones del agua, alimentación y prevención de enfermedades (Lastra *et al*, 2016).

La técnica biofloc es una excelente alternativa de cultivo, que consiste en aprovechar residuos de materia orgánica, alimento y compuestos inorgánicos tóxicos (los cuales conllevan al deterioro de la calidad del agua y al poco aprovechamiento del alimento natural), a través de microorganismos presentes en los medios acuáticos, dando condiciones de dominancia a comunidades bacterianas quimio / foto autótrofos y heterótrofas, resolviendo así sustancialmente los problemas de saturación de nutrientes a partir de su reciclaje. Sin embargo, esta técnica de producción genera materia orgánica y residuos que carecen de algún uso y; generalmente, termina siendo desechado (Avnimelech, 2009).

Con el objetivo de aprovechar los residuos de una producción con sistema biofloc, se ha desarrollado la harina de biofloc con el cual, se han realizado varios trabajos de investigación. La harina de biofloc es el resultado de la recolección y posterior deshidratación de los residuos sólidos suspendidos obtenidos del agua de un cultivo con sistema biofloc, algunos de los residuos orgánicos contienen un alto porcentaje proteínico con potencial para un uso alimenticio que permita sustituir de la harina de pescado o soya (Rodríguez *et al*, 2018).

Pocos estudios han utilizado la harina de biofloc como ingrediente en dietas acuícolas. La inclusión de harina de biofloc como ingrediente en dietas para camarón, incrementaron el rendimiento del crecimiento de *L. vannamei* (Ju *et al.*, 2008; Kuhn *et al.*, 2009, 2010). La aplicación de biofloc mejoró la conversión de alimento y retención de proteínas que indica indirectamente que el consumo de biofloc contribuye al crecimiento de organismos cultivados (Avnimelech, 2009; Hari *et al.*, 2004; Wasieliesky y col. 2006; Xu *et al.*, 2012).

De acuerdo con Xu *et al.*, (2012), los bioflocs afectan positivamente el aparato digestivo y actividad enzimática de los organismos acuáticos. Anand *et al.*, (2014) concluyeron que la actividad digestiva de los animales era mejorada cuando la dieta artificial se suplementaba con biofloculos. Para tilapia los resultados son bastante alentadores. Los biofloculos pueden contener hasta un 30% de proteína cruda en su composición y alrededor del 2% de lípidos (Azim y Little, 2008; Ballester *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2014; Xu y Pan,

2012). La tilapia utiliza muy bien el biofloc como fuente de alimento, y el biofloc puede alcanzar hasta un 50% de los requerimientos proteicos de tilapia. (Avnimelech, 2007; Azim y Little, 2008).

La harina de biofloc presenta alto contenido de cenizas, que puede estar relacionado con la abundancia de óxidos insolubles en ácido y silicatos mixtos (Tacon *et al.*, 2002). Los minerales acumulados y metales también pueden contribuir a la alta cantidad de ceniza. Biofloc puede ser una buena fuente de minerales y oligoelementos (Tacon *et al.*, 2002; Ju *et al.*, 2012) y puede contribuir al crecimiento animal (Avnimelech, 2006).

Estudios anteriores han informado un aumento en la tasa de crecimiento, bienestar y supervivencia de peces criados en sistemas basados en flóculos microbianos (Tacon *et al.*, 2002); sin embargo, los estudios que han usado flóculos como ingredientes en las dietas de acuicultura están limitados. Kuhn y col. (2009) reemplazó el 37% de la harina de pescado en la alimentación de camarones, logrando un rendimiento similar al de las dietas que contenía niveles de reemplazo más bajos. En otro estudio Kuhn y col. (2010) no encontró efectos nocivos sobre el crecimiento de los camarones alimentados con dietas que contenían inclusión de biofloc del 10 al 30%, independientemente de la sustitución de harina de pescado (0 - 67%).

Científicos concluyen que una dieta con 20% de harina de biofloc puede mejorar el crecimiento de tilapia y camarón significativamente (Himaja 2016, Dantas *et al.* 2016, Prabu *et al.*, 2018). Sin embargo, Bauer *et al.* (2012) declaró que la harina de pescado en la dieta de post larva de *L. vannamei* podría ser reemplazada por harina de biofloc hasta 30%.

La inclusión de 20% produjo un mejor aumento de peso y FCR más bajo comparado con otros trabajos donde el nivel máximo de inclusión fue 40% de inclusión. Este resultado está de acuerdo con Ajiboye *et al.*, (2012) y Kissling y Askbrandit (1993) que observaron reducción en la tasa de crecimiento de los peces a niveles más altos de suplementación microbiana. Los productos microbianos a niveles más altos tienden a reducir la palatabilidad y digestibilidad del alimento.

Conclusión

La harina de Biofloc representa un ingrediente importante y alternativo para el desarrollo de la alimentación para peces, en particular reduciendo la dependencia de la harina de pescado, así como el impacto ambiental. Estos resultados mostraron la posibilidad del uso de fuentes alternas a la harina de pescado como fuente de proteína en dietas de juveniles de la tilapia. El efecto positivo de las dietas demuestra claramente que la harina de biofloc es un ingrediente alternativo viable y puede usarse en la dieta hasta el 20% de inclusión.

Referencias bibliográficas

- Ajiboye, O. O., Yakubu, A. F. and Adams, T. E. 2012. A perspective on the ingestion and nutritional effects of feed additives in farmed fish species. *World J. Fish Mar. Sci.*, 4(1): 87-101.
- Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C). (1997). *Official Methods of Analysis* 20th Ed. Edited by Kenneth Heirich. Washington D.C. pp 1110-1117.
- Avnimelech, Y. (1999) Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176: 227-235.
- Avnimelech, Y. (2007) Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264: 140-147.
- Avnimelech, Y. (2009) *Biofloc Technology — A Practical Guide Book*. Baton Rouge, LA: The World Aquaculture Society, p. 182.
- Azim, M.E., and Little, D.C. (2008) The bioflocs technology (BFT) in indoor tanks: water quality, bioflocs composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 283: 29-35.
- Ballester ELC, PC Abreu, RO Cavalli, M Emerenciano, L Abreu & W Wasielesky. 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquaculture Nutrition* 16: 163-172
- Bauer, W., Prentice-Hernandez, C., Tesser, M. B., Wasielesky, W. and Poersch, L. H. 2012. Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 342: 112-116.
- Bossier, P., & Ekasari, J. (2017). Biofloc technology application in aquaculture to support sustainable development goals. *Microbial biotechnology*, 10(5), 1012-1016.
- Chaparro Acuña, Sandra Patricia; Aristizábal Torres, Iván Darío; Gil González, Jesús Humberto COMPOSICIÓN Y FACTORES ANTINUTRICIONALES DE LAS SEMILLAS DEL GÉNERO *Mucuna* Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín, vol. 62, núm. 1, 2009, pp. 4843-4853.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. (2018). Aumenta en 2017 la producción pesquera y acuícola nacional a 1.8 millones de toneladas: CONAPESCA. México, D.F.: CONAPESCA. Recuperado de: <https://www.gob.mx/conapesca/prensa/aumenta-en-2017-la-produccion-pesquera-y-acuicola-nacional-a-1-8-millones-de-toneladas-conapesca?idiom=es>.
- Da Silva, K.R., Wasielesky, W., and Abreu, P.C. (2013) Nitrogen and phosphorus dynamics in the biofloc production of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac Soc* 44: 30-41.
- Dantas Jr E M, Valle B C S, Brito C M S, Calazans N K F, Peixoto S R M, Soares R B. 2016. Partial replacement of fishmeal with biofloc meal in the diet of postlarvae of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 22 (2): 335-342.

- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., & Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(3-4), 125-137.
- Ferreira, Gabriela Soltes, et al. "Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*." *Aquaculture* 448 (2015): 273-279.
- Furuya WM, Pezzato LE, Pezzato AC, Miranda EC, Furuya VRB and Barros MM. Digestibilidade Aparente da energia e nutrientes do farelo de Canola pela Tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev Bras Zootec* 2001; 30:611-616.
- Gallardo-Collí, A., Pérez-Rostro, C. I., & Hernández-Vergara, M. P. (2019). Reuse of water from biofloc technology for intensive culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): effects on productive performance, organosomatic indices and body composition. *International Aquatic Research*, 11(1), 43-55.
- Gasco, L., Gai, F., Maricchiolo, G., Genovese, L., Ragonese, S., Bottari, T., & Caruso, G. (2018). Fishmeal alternative protein sources for aquaculture feeds. In *Feeds for the Aquaculture Sector* (pp. 1-28). Springer, Cham.
- Gaspar R. Poot-López, Eucario Gasca-Leyva and Miguel A. Olvera-Novoa. 2012. Nile tilapia production (*Oreochromis niloticus* L.) using tree spinach leaves (*Cnidoscolus chayamansa* McVaugh) as a partial substitute for balanced feed. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*,
- Gaxiola, G. and Cuzon*, G. 2015. "Floc" Story. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Rivas Vega, M. y Miranda Baeza, A. (Eds), *Nutrición Acuicola: Investigación y Desarrollo*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-0593-7, pp. 23-5040(4): 835-846, 202.
- Hargreaves, J. A. (2013). Biofloc production systems for aquaculture. SRAC Publication n°4503.
- Himaja, P. H. S. 2016. Performance of biofloc meal in the diet of catla, *Catla catla* (Hamilton, 1822). M. F. Sc. dissertation, Fisheries College and Research Institute, Thoothukudi, Tamil Nadu Fisheries University, India.
- Jatobá, A., Borges, Y. V., & Silva, F. A. (2019). BIOFLOC: sustainable alternative for water use in fish culture. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(3), 1076-1080.
- Ju Zy, I Forster, L Conquest, W Dominy, 2008. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc fractions to a formulated diet. *Aquaculture Nutrition*, 14: 533-543.
- Kiessling, A. and Askbrandt, S. 1993. Nutritive value of two bacterial strains of single-cell protein for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 109(2): 119-130.
- Kuhn, David D., Lawrence Addison L. , Boardman Gregory D. , Patnaik Satyendra 2010. Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of fish effluent as feed ingredients for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 303 (1): 28-33.

- Lima, E. C. R. D., Souza, R. L. D., Girao, P. J. M., Braga, Í. F. M., & Correia, E. D. S. (2018). Culture of Nile tilapia in a biofloc system with different sources of carbon. *Revista Ciência Agrônômica*, 49(3), 458-466.
- Lovera, K. P. Z., Brito, L. O., Arana, L. A. V., GALVEZ, A. O., & CÁRDENAS, J. M. V. (2018). Cultivo de alevinos de tilápia em sistema de bioflocos sob diferentes relações carbono/nitrogênio. *Boletim do Instituto de Pesca*, 43(3), 399-407.
- Luo, G., Gao, Q., Wang, C., Liu, W., Sun, D., Li, L., et al. (2014) Growth, digestive activity, welfare, and partial costeffectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture* 422: 1–7
- Manan, H., Moh, J.H.Z., Kasan, N.A. et al., *Appl Water Sci* (2017) 7: 2437. <https://doi.org/10.1007/s13201-016-0421-4>
- Olvera-Novoa, M. Domínguez-Cen J. Oliveira L. Martinez-Palacios C. A. 2008. Effect of the use of the microalga *Spirulina maxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), fry. *Aquaculture Research* 29(10):709 – 715.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2016). Resumen: el estado mundial de la pesca y la acuicultura. Italia, Roma: FAO. Pp. 8-16.
- Pérez-Fuentes JA, Hernández-Vergara MP, Pérez-Rostro CI, Fogel I (2016) C: N ratios affect nitrogen removal and production of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised in a biofloc system under high density cultivation. *Aquaculture* 425:247–251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.010>
- Pérez-Fuentes, Jorge Alberto, et al. "Variation of the bacterial composition of biofloc and the intestine of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, cultivated using biofloc technology, supplied different feed rations." *Aquaculture research* 49.11 (2018): 3658-3668.
- Pezzato LE, Miranda EC, Barros MM, Pinto LGQ, Furuya WM, and Pezzato AC. Digestibilidade aparente de Ingredientes pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev Bras Zootec* 2002; 31:1595-1604.
- E. Prabu, C. B. T. Rajagopalsamy, B. Ahilan, Jegan Michael Andro Jeevagan and M. Renuhadev. 2018. Effect of dietary supplementation of biofloc meal on growth and survival of GIFT tilapia *Indian Journal of Fisheries* 65(1):65-70.
- Poot, G. y Gasca, E. (2016). Pasado y presente de la acuicultura en Yucatán. *Bioagrociencias*. 9 (2): 27-34.
- Silva, A. F. (2017). El papel de los microorganismos en la tecnología biofloc. *Panorama Acuícola Magazine*. Julio/Agosto 22 (4): 93-95.
- Silva, A. F. (2019). Buscando nuevas fuentes de proteína: harina de biofloc. *Panorama acuícola Magazine*. 24(1): 96-97.
- Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. (1969). *Introducción a la bioestadística*. Omega. España. pp 362.
- Tacon, A. G. J., Cody, J. J., Conquest, L. D., Divakaran, S., Forster, I. P. and Decamp, O. E. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquac. Nutr.*, 8(2): 121-137.

- Vásquez-Torres, Walter; Yossa Perdomo, Martha I; Hernández Arévalo, Gilma; Gutiérrez Espinosa, Mariana C Digestibilidad aparente de ingredientes de uso común en la fabricación de raciones balanceadas para tilapia roja híbrida (*Oreochromis sp.*) Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, vol. 23, núm. 2, abril-julio, 2010, pp. 207-216.
- Wei, Y., Liao, S. A., & Wang, A. L. (2016). The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. *Aquaculture*, 465, 88-93.
- Xu, W.J., and Pan, L.Q. (2012) Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. *Aquaculture* 356: 147–152.
- Yu, E., Xie, J., Wang, J., Ako, H., Wang, G., Chen, Z., & Liu, Y. (2016). Surface-attached and suspended bacterial community structure as affected by C/N ratios: relationship between bacteria and fish production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(7), 116.
- Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A. and Browdy, C. L. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258(1): 396-403.

Nanopartículas de Plata como Aditivo en Alimentos para Control de Enfermedades Causadas por *Vibrio* en *L. vannamei*

Maribel Maldonado-Muñiz, Nieto-López Martha Guadalupe, Lucia Elizabeth Cruz-Suárez
Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Ciencias Biológicas (FCB),
Programa Maricultura. Av. Universidad S/N, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66455,
México. Tel/Fax: +52 81 8352-6380

e-mail: maribel.maldonadomn@uanl.edu.mx; lucia.cruzs@uanl.edu.mx

Resumen

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son conocidas por sus ya demostradas actividades antibacterianas, antivirales, y antifúngicas. Esto, ha provocado un aumento sobre su investigación y posible aplicación como agente terapéutico en el sector acuícola con la finalidad de minimizar las pérdidas económicas ocasionadas por enfermedades emergentes. Sin embargo, hoy en día los estudios realizados sobre este tema en camarón son incipientes. Durante los últimos 5 años nuestro grupo de investigación ha evaluado la efectividad de nanopartículas de plata, sintetizadas a base de extractos de algas marinas mexicanas, como agente antimicrobiano suplementado en dietas para el control de la *Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND)* producida por cepas de *Vibrio parahaemolyticus*. En este trabajo se presenta una revisión de las investigaciones sobre el uso de AgNPs en dietas para camarón incluyendo los avances generados por nuestro grupo en cuanto a: 1) síntesis, 2) evaluación *in vitro*, 3) estandarización de la inclusión de AgNPs en dietas pelletizadas y evaluación de su estabilidad, y 4) Efecto del consumo de estos alimentos en: sobrevivencia de camarones desafiados, microbioma fecal, histología, toxicidad, bioacumulación y depuración en diferentes tejidos.

Palabras clave: Nanopartículas, macroalgas, camarón, anti-*Vibrio*

Introducción

En México el 71 % de la producción de camarón es por acuicultura, la industria del cultivo de camarón es una de las actividades económico-productivas del sector acuícola más importantes del país, en 2018 la producción de camarón por esta vía fue de 170,000 toneladas dejando una derrama económica de 452 millones de dólares, despuntando Sinaloa y Sonora como los principales estados productores (<https://www.jornada.com.mx/ultimas/politica/2019/02/14/industria-del-camaronfundamental-para-economia-de-mexico-2788.html>). Dentro de la producción mundial, México se encuentra enlistado en el séptimo lugar, posicionándose dentro de los principales exportadores a mercados internacionales importantes como: Estados Unidos de América, Vietnam y Francia (CONAPESCA, 2017).

Uno de los principales problemas que enfrenta el cultivo de camarón son las enfermedades emergentes ocasionadas por bacterias, virus, parásitos y hongos, siendo las de origen bacteriano la principal causa de mortalidad. (Aguirre-Guzmán *et al.* 2004). Las bacterias del género *Vibrio* son la causa de enfermedades graves tales como: vibriosis y la *Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND)* denominada anteriormente como *Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS)*, en la cual los microorganismos se introducen vía oral colonizando rápidamente el tracto digestivo y durante la fase aguda de la enfermedad, estas bacterias producen una toxina que provoca disfunción o lisis del hepatopáncreas, causando mortalidades del 90 % de la producción, lo cual representa pérdidas invaluable a la industria acuícola (Gomez-Gil *et al.* 2014; Yang *et al.* 2014).

El uso de antibióticos para controlar las cepas de *Vibrio* en la acuicultura de camarón se encuentra restringido en la mayoría de los países (Krishnamoorthy *et al.* 2014; OIE, 2014), debido a que en los últimos años el uso desmedido de antibióticos sintéticos para contrarrestar estas y otras enfermedades ha causado cambios en las comunidades bacterianas, las cuales a su vez han desarrollado resistencia a estos compuestos haciendo cada vez más difícil el tratamiento de dichas enfermedades. Por esta razón, el desarrollo e investigación de antimicrobianos alternativos “verdes” o amigables con el medio ambiente, que se administren

en muy pequeñas cantidades, de precio accesible, fáciles de producir además de no generar resistencia en los microorganismos, ha tomado auge durante la última década. Dentro de este contrastante desarrollo, se ha recurrido al uso de la nanotecnología, la cual puede ofrecernos precisamente compuestos con las características antes mencionadas, esto mediante la nanoestructuración de compuestos naturales (Rai *et al.* 2009; Swain *et al.* 2014; Chinnappan *et al.* 2015; Sivaramasamy and Zhiwei 2016a). El uso de nanopartículas (sintetizadas a partir de recursos marinos) como un aditivo antibacteriano en los alimentos para camarón podría ser una forma de alternativa viable. Sin embargo, el uso de las nanopartículas en la acuicultura es poco usual debido a que su introducción es reciente y por ello existen algunas interrogantes sobre su utilización, una de ellas es su toxicidad. Además, existen pocos estudios que determinen cuales son las dosis que funcionan efectivamente para el control de enfermedades y en los cuales se defina la mejor forma de administración, así como su tasa de acumulación y depuración, además de los cambios en los consorcios bacterianos dentro del tracto gastrointestinal de los organismos ocasionados por su consumo.

Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) con extractos de macroalgas

Las algas marinas son consideradas una rica fuente de metabolitos biológicamente activos con propiedades antifúngicas, antibacteriales y antivirales; además entre sus aplicaciones sus extractos se han destacado como excelentes agentes reductores y formadores de nanopartículas altamente estables (Singaravelu *et al.* 2007; Ponnuchamy and Jacob 2016). Actualmente, se han reportado al menos 38 trabajos de investigación donde se reporta la síntesis verde de nanopartículas de oro o plata utilizando diferentes tipos de extractos acuosos, hidroetanólicos y de acetato de etilo, realizados a partir de algas verdes (24 %), rojas (21 %) y cafés (55 %), las nanopartículas sintetizadas se han reportado con rangos de tamaño que van desde los 2 a los 96 nm (ver Figura 1 y Tabla 1). Como ventajas, estos autores resaltan su alta tasa de síntesis, además de una excelente estabilidad coloidal incluso mejor que las nanopartículas sintetizadas con otros compuestos reductores de origen fitoquímico; estos autores concluyen que el poder reductor para formar las nanopartículas metálicas es

atribuido a los polisacáridos sulfatados, alcaloides, esteroides, fenoles, saponinas, flavonoides y grupos funcionales derivados de estos compuestos presentes en las algas (ver tabla 1).

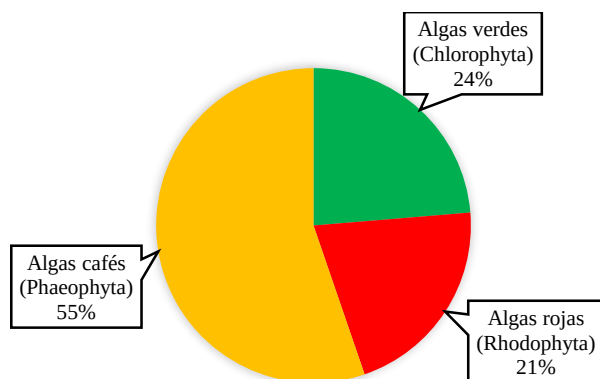


Figura 1. Relación en porcentaje (%) de publicaciones sobre síntesis de nanopartículas de plata y oro utilizando extractos de algas verdes, rojas y cafés

Tabla 1. Nanopartículas metálicas sintetizadas a partir de algas verdes, rojas y cafés

Alga	Tipo	Tamaño (nm)	Forma	Agente reductor	Aplicación	Referencia
Algas verdes (<i>Chlorophyta</i>)						
<i>Ulva lactuca</i>	Plata	48.59	Esférica	Compuestos fenólicos, aminos y anillos aromáticos	Degradación foto catalítica	(Kumar <i>et al.</i> 2013a)
<i>Ulva lactuca</i>	Plata	10 a 30	Esférica	Fitoquímicos	Actividad antibacteriana	(Raja <i>et al.</i> 2012)
<i>Ulva fasciata</i>	Plata	40.05	Esférica	Extracto crudo de acetato de etilo	Actividad antibacteriana	(Rajesh and Raja 2012)
<i>Urospora spp.</i>	Plata	20 a 30	Esférica	Fitoquímicos	Actividad antibacteriana	(Suriya <i>et al.</i> 2012)
<i>Codium capitatum</i>	Plata	3 a 44	Nano-clúster	Proteínas	-	(Kannan <i>et al.</i> 2013)
<i>Enteromorpha flexuosa</i>	Plata	2 a 32	Circular	-	Actividad antibacteriana	(Yousefzadi <i>et al.</i> 2014)
<i>Caulerpa scalpeliformis</i>	Plata	-	Esférica y cubica	Aminoácidos y proteínas	Mosquicida	(Murugan <i>et al.</i> 2015a)
<i>Ulva lactuca</i>	Plata	-	Cubica	Polifenoles	Control de Malaria	(Murugan <i>et al.</i> 2015b)
<i>Ulva clatratha</i>	Plata y cloruro de plata	9.50	Esférica y polimórfica	Polisacáridos, proteínas y compuestos fenólicos	Actividad antibacteriana	Maldonado- Muñiz <i>et al</i> 2019
Algas rojas (<i>Rhodophyta</i>)						
<i>Acanthophora spicifera</i>	Plata	48	Esférica	Compuestos fenólicos	Actividad antibacteriana	(Kumar <i>et al.</i> 2012c)
<i>Gracillaria corticata</i>	Plata	18 a 46	Esférica	Polifenoles y taninos	Actividad antifúngica	(Kumar <i>et al.</i> 2013b)
<i>Gelidiella acerosa</i>	Plata	22	Esférica	Compuestos aromáticos alcanos y aminos	Actividad antifúngica	(Satish <i>et al.</i> 2017)
<i>Hypnea musciformis</i>	Plata	2 a 55.8	Cubica	Péptidos cíclicos	Degradación foto catalítica	(Ganapathy Selvam and Sivakumar 2015)
<i>Hypnea musciformis</i>	Plata	40 a 65	Esférica	Oxidación <i>In situ</i> de grupos hidroxilo	Actividad larvica	(Roni <i>et al.</i> 2015)
<i>Galaxaura elongata</i>	Oro	3.8 a 77.1	Esférica	Residuos amino y péptidos de proteínas	Actividad antibacteriana	(Abdel-Raouf <i>et al.</i> 2013)
<i>Pterocladia capillacea</i>	Plata	11.4	Esférica	Proteínas	Actividad anticáncer	(El Kassas and Attia 2014)
<i>Corallina officinalis</i>	Oro	14.6	Esférica	Grupos funcionales hidroxilo- y amino	Actividad anticáncer	(El-Kassas and El-Sheekh 2014)

Maldonado-Muñiz, M., Nieto-López Martha Guadalupe, Cruz-Suárez, L.E. 2019. Nanopartículas de Plata como Aditivo en Alimentos para Control de Enfermedades Causadas por *Vibrio* en *L. vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 168-199.

Algas cafés (*Phaeophyta*)

<i>Sargassum wightii</i>	Oro	8 a 12	Esférica	-	-	(Singaravelu <i>et al.</i> 2007)
<i>Sargassum wightii</i>	Plata	8 a 27	Esférica	Grupos alcohólicos y ácidos carboxílicos	Actividad antibacteriana	(Govindaraju <i>et al.</i> 2009)
<i>Sargassum wightii</i>	Plata	15 a 20	Esférica	Polifenoles, proteínas/enzimas y/o polisacáridos	Actividad antibacteriana	(Shanmugam <i>et al.</i> 2014)
<i>Sargassum longifolium</i>	Plata	30	Cubica	Proteínas	Actividad anticáncer	(Saraniya Devi <i>et al.</i> 2013)
<i>Padina tetrastromatica</i>	Plata	20	Esférica	Compuestos aromáticos, alcanos o amidas	-	(Jegadeeswaran <i>et al.</i> 2012)
<i>Sargassum ilicifolium</i>	Plata	33 a 44	Esférica	-	Actividad antibacteriana y citotóxica in vivo	(Kumar <i>et al.</i> 2012a)
<i>Sargassum tenerrimum</i>	Plata	20	Esférica	Grupos hidroxilo-, metoxi-, cetonas y polisacáridos	Actividad antibacteriana	(Kumar <i>et al.</i> 2012b)
<i>Sargassum myriocystum</i>	Plata	10 a 23	Esférica	Polisacáridos extracelulares	-	(Stalin Dhas <i>et al.</i> 2012)
<i>Sargassum polycystum</i>	Plata	50 a 100	Esférica	Grupos carboxílicos, amino, fosfato e hidroxilo	Actividad anticáncer	(Thangaraju <i>et al.</i> 2012)
<i>Turbinaria conodies</i>	Oro	96	Esférica	Polifenoles, polisacáridos y aminas primarias	Actividad antibacteriana	(Rajeshkumar <i>et al.</i> 2013)
<i>Stoemchospermum marginatum</i>	Oro	18.7 a 93.7	Esférica, triangular y hexagonal	Terpenoides, polifenoles y compuestos fenólicos	Actividad antibacteriana	(Arockiya Aarthi Rajathi <i>et al.</i> 2012)
<i>Cystophora moniliformis</i>	Plata	75	Esférica	-	-	(Prasad <i>et al.</i> 2013)
<i>Padina gymnospora</i>	Plata	20 a 40	Esférica	-	Actividad antibacteriana	(Singh <i>et al.</i> 2013)
<i>Sargassum cinereum</i>	Plata	45 a 75	-	-	Actividad antibacteriana	(Mohandass <i>et al.</i> 2013)
<i>Silvetia compressa</i>	Plata	1 a 35	Esférica y polimórfica	Polisacáridos, proteínas y polifenoles de extracto acuoso	Actividad antibacteriana	(Maldonado-Muñiz <i>et al.</i> 2016)
<i>Ecklonia arborea</i>	Plata	1 a 25	Esférica y polimórfica	Polisacáridos, proteínas y polifenoles de extracto acuoso	Actividad antibacteriana	(Maldonado-Muñiz <i>et al.</i> 2016)
<i>Cystoseira osmundacea</i>	Plata	1 a 45	Esférica y polimórfica	Polisacáridos, proteínas y polifenoles de extracto acuoso	Actividad antibacteriana	(Maldonado-Muñiz <i>et al.</i> 2016)
<i>Silvetia compressa</i>	Plata	10 a 35	Esférica y polimórfica	Polisacáridos, proteínas y polifenoles de extracto etanólico	Actividad antibacteriana	(Maldonado-Muñiz <i>et al.</i> 2016)

Maldonado-Muñiz, M., Nieto-López Martha Guadalupe, Cruz-Suárez, L.E. 2019. Nanopartículas de Plata como Aditivo en Alimentos para Control de Enfermedades Causadas por *Vibrio* en *L. vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 168-199.

<i>Ecklonia arborea</i>	Plata	10 a 70	Esférica y polimórfica	Polisacáridos, proteínas y polifenoles de extracto etanólico	Actividad antibacteriana	(Maldonado-Muñiz <i>et al.</i> 2016)
<i>Pterygophora californica</i>	Plata	10 a 70	Esférica y polimórfica	Polisacáridos, proteínas y polifenoles de extracto etanólico	Actividad antibacteriana	(Maldonado-Muñiz <i>et al.</i> 2016)

Maldonado-Muñiz *et al.* 2016 reportan la producción de AgNPs sintetizadas con una metodología “verde” (Luna *et al.* 2015) utilizando como agente reductor extractos acuosos e hidroetanólicos (al 50 %) de macroalgas mexicanas, una de ellas obtenida por técnica cultivo a larga escala (*Ulva clatratha*) previamente reportada por Peña-Rodríguez *et al.* 2011 y seis más colectadas del medio natural en la zona de Baja California (*Silvetia compressa*, *Cystoseira osmundacea*, *Eisenia arborea*, *Pterygophora californica*, *Macrocystis pyrifera* y *Egregia menziesii*); de las 14 reacciones propuestas en este trabajo, se obtuvieron 7 estables: 3 con extractos hidroetanólicos (*Silvetia*, *Eisenia* y *Pterygophora*) y 4 con extractos acuosos (*Ulva*, *Silvetia*, *Eisenia* y *Pterygophora*), para este caso las AgNPs producidas con extractos acuosos fueron visualmente más estables ya que presentaron un mejor efecto reductor basado en producción de color (café- rojizo), menor turbidez y no presentaron precipitación durante las 24 horas posteriores a la síntesis, además se obtuvieron distribuciones de tamaño de partículas menores que las realizadas con extractos hidroetanólicos (Tabla 1); finalmente, en todos los casos las AgNPs sintetizadas fueron de forma esférica y polimórfica (Tabla 1, Figura 2). Las AgNPs sintetizadas por nuestro grupo de investigación coinciden con los valores de distribución reportados previamente por otros autores, así como también con las moléculas responsables del poder reductor y estabilizante, sin embargo, es la primera vez que se reporta síntesis de AgNPs con especies de algas colectadas en México; en el caso de las AgNPs sintetizadas con *Ulva clatratha* es la primera vez que se utilizan extractos de alga obtenida en un sistema de producción a gran escala, para este caso el origen del alga representa una ventaja sobre las especies colectadas del medio natural ya que su composición puede presentar una menor variación debido a los cambios estacionales y zona de colecta,

además debido a que su producción es constante se puede garantizar el escalamiento para la obtención de estas AgNPs.

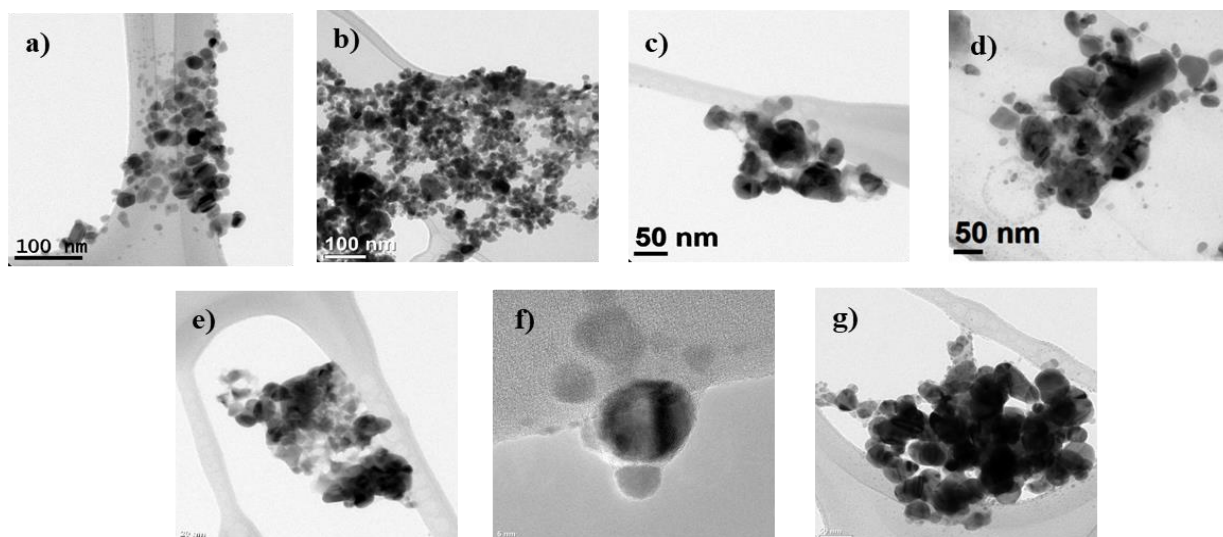


Figura 2. Imágenes de Microscopia de Transmisión Electrónica de nanopartículas de plata sintetizadas con extractos acuosos e hidroetanólicos de macroalgas mexicanas. *a) Silvetia compressa etanólico, b) Ecklonia arborea etanólico, c) Cystoseira osmundacea etanólico, d) Ulva clatratha acuoso, e) Pterygophora californica acuoso, f) Silvetia compressa acuoso, g) Ecklonia arborea acuoso*

Actividad anti-*Vibrio* in vitro de nanopartículas

Actualmente, se han reportado estudios que han demostrado la eficacia antibacteriana de AgNPs sintetizadas con diversos agentes reductores entre ellos extractos de plantas, bacterias, membranas poliméricas, además de plata coloidal contra cepas de *Vibrio* de importancia humana y acuícola, lo cual sugiere que el uso de AgNPs podría ser un tratamiento efectivo contra las enfermedades ocasionadas por estas cepas. Dentro de estos trabajos, se reporta un amplio rango de zonas de inhibición que va desde los 2.1 hasta a los 21.25 mm obtenidos con dosis de 8.5-10 μg por disco, entre las especies de *Vibrio* probadas se encuentran cepas, tales como: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio cholerae* (ver referencias y datos en Tabla 2).

Por otra parte, se ha demostrado que las cepas de *Vibrio* causantes de AHPND+ son susceptibles al tratamiento con AgNPs, un estudio reciente reportado por Sivaramasamy y colaboradores en 2017, demuestra la actividad antibacteriana de AgNPs sintetizadas a partir de una membrana polimérica de carboxycelulosa contra cepas de *Vibrio harveyi* y *parahaemolyticus* AHPND+, donde una dosis de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ provoca una inhibición de 10 ± 1.8 y 11 ± 2.1 mm respectivamente. Nuestro grupo de investigación (Maldonado-Muñiz *et al.* 2019) reporta que las AgNPs sintetizadas con extractos de macroalgas también poseen actividad antimicrobiana contra cepas de *Vibrio parahaemolyticus* AHPND+ obteniendo zonas de inhibición similares (11.3–12.32 mm) a las obtenidas por Sivaramasamy y colaboradores en 2017 incluso a una dosis de prueba menor que la reportada (1 μg por disco).

Como complemento de esta investigación se evaluó la actividad antibacteriana por difusión en disco Kirby-Bauer de 7 AgNPs sintetizadas con extractos acuosos e hidroetanólicos de macroalgas mexicanas contra cepas de *V. parahaemolyticus*: M9-04, M6-05, M5-28 (AHPND+) y CAIM 170, y para *V. harveyi* CAIM 1792, *V. campbelli* CAIM 333 y *V. vulnificus* CAIM 611; además, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) mediante microdilución en placa utilizando AgNO_3 como control positivo (Figura 3 y 4).

El método de difusión en disco mostró que las AgNPs de *Ulva* acuosas ($p<0.001$) y el control (AgNO_3) ($p<0.001$) son los tratamientos que obtuvieron mayor zona de inhibición para las cepas evaluadas con valores promedio de 12.41 y 11.14 mm respectivamente. La cepa M5-28 con 11.84 mm de inhibición promedio ($p<0.001$) mostró ser la de mayor susceptibilidad, en medio sólido, a todos los tratamientos evaluados (Figura 3).

Los valores de CMI y CMB mostraron que las AgNPs de *Ulva* acuosas ($p<0.001$) nuevamente fueron las más efectivas con valores promedio de 4.37^a y $8.43^a \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p<0.001$) para CMI/CMB respectivamente, y las AgNPs de *Silvetia* hidroetanólicas fueron las que presentaron menor efectividad con valores de 10.26^c y $20.53^c \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p<0.001$) para CMI/CMB respectivamente. La cepa CAIM333 fue la más susceptible en medio líquido con

valores promedio de 4.75^a y 8.75^a µg mL⁻¹ para CMI/CMB respectivamente. Se concluyó que para este caso las AgNPs sintetizadas con el extracto acuoso de la macroalga *Ulva clathrata* presentan la mejor actividad antibacteriana contra cepas de *Vibrio in vitro*. Los valores de MIC y MBC obtenidos para las AgNPs fueron inferiores a los reportados por Petrus *et al.* 2011 donde se evaluó Ag coloidal contra otras cepas de *Vibrio* y reportaron un MIC de 9.64 µg mL⁻¹ y un MBC >100 µg mL⁻¹.

Tabla 2. Actividad anti-*Vibrio* in vitro de nanopartículas de plata

Agente reductor	Composición	Concentración utilizada	Cepas de <i>Vibrio</i> / mm de inhibición	mm de inhibición	Referencia
Algas					
<i>Ulva clatratha</i>	Plata y cloruro de plata	1 µg por disco	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (AHPND +)		Maldonado-Muñiz <i>et al</i> 2019
			M9-04	12.32 ± 0.08 mm	
			M6-05	11.76 ± 0.20 mm	
			M5-28	11.3 ± 0.1 mm	
Bacterias					
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Plata	50 µL de 1 mM (8.5 µg por disco)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	25+ 1.0 mm	(Singh <i>et al.</i> 2015)
<i>Bacillus subtilis</i>	Plata	50 µL de 1 mM (8.5 µg por disco)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	21.25 ± 2.55 mm	(Sivaramasamy and Zhiwei 2016a)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Plata	-	<i>Vibrio harveyi</i>	19.27 ± 1.36 mm	
			<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	20 mg ml ⁻¹ , 3 mm	(Shanthi <i>et al.</i> 2016)
				30 mg ml ⁻¹ , 4 mm	
				50 mg ml ⁻¹ , 6 mm	
				100 mg ml ⁻¹ 8 mm	
Plantas					
<i>Camellia Sinensis</i>	Plata	10 µg por disco	<i>Vibrio cholerae</i>	13-15 nm	(Geoprincy <i>et al.</i> 2011)
<i>Proposis chillensis</i>	Plata	50 µL de 1 mM (8.5 µg por disco)	<i>Vibrio parahamolitycus</i>	19 ± 2.8 mm	(Kandasamy <i>et al.</i> 2012)
			<i>Vibrio harveyi</i>	16 ± 2.7 mm	
			<i>Vibrio cholerae</i>	22 ± 3.5 mm	

Maldonado-Muñiz, M., Nieto-López Martha Guadalupe, Cruz-Suárez, L.E. 2019. Nanopartículas de Plata como Aditivo en Alimentos para Control de Enfermedades Causadas por *Vibrio* en *L. vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 168-199.

<i>Azadirachta indica</i>	Plata	10µl µg por disco	<i>Vibrio cholerae</i>	14 nm	(Renugadevi and Venus Aswini 2012)
Otros					
Membrana de carboxycelulosa	Plata	10 µg ml ⁻¹	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> AHPND + <i>Vibrio harveyi</i> AHPND +	11 + 2.1 mm 10 + 1.8 mm	(Sivaramasamy <i>et al.</i> 2017)
Plata coloidal	Plata coloidal	15 ppm	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> AHPND +	3.0 mg ml ⁻¹ -12.0 4.5 mg ml ⁻¹ -13.8 6.0 mg ml ⁻¹ -16.8 8.0 mg ml ⁻¹ -18.8	(Morales-Covarrubias <i>et al.</i> 2016)

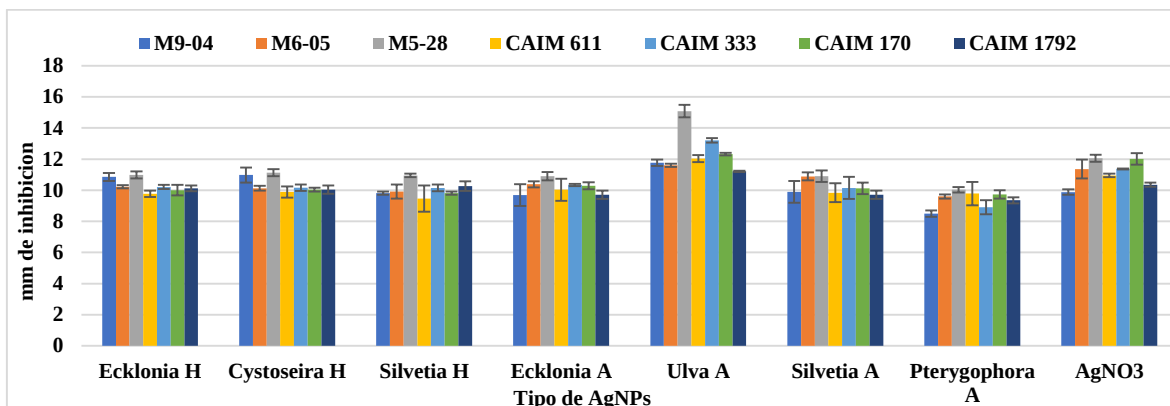


Figura 3. Actividad antibacteriana de AgNPs sintetizadas con extractos de macroalgas mexicanas mediante difusión en disco Kirby-Bauer, mm de inhibición $\pm$ desviación estándar obtenidos a 1 μ g de AgNPs/disco (H: extracto hidroetanólico; A: extracto acuoso).

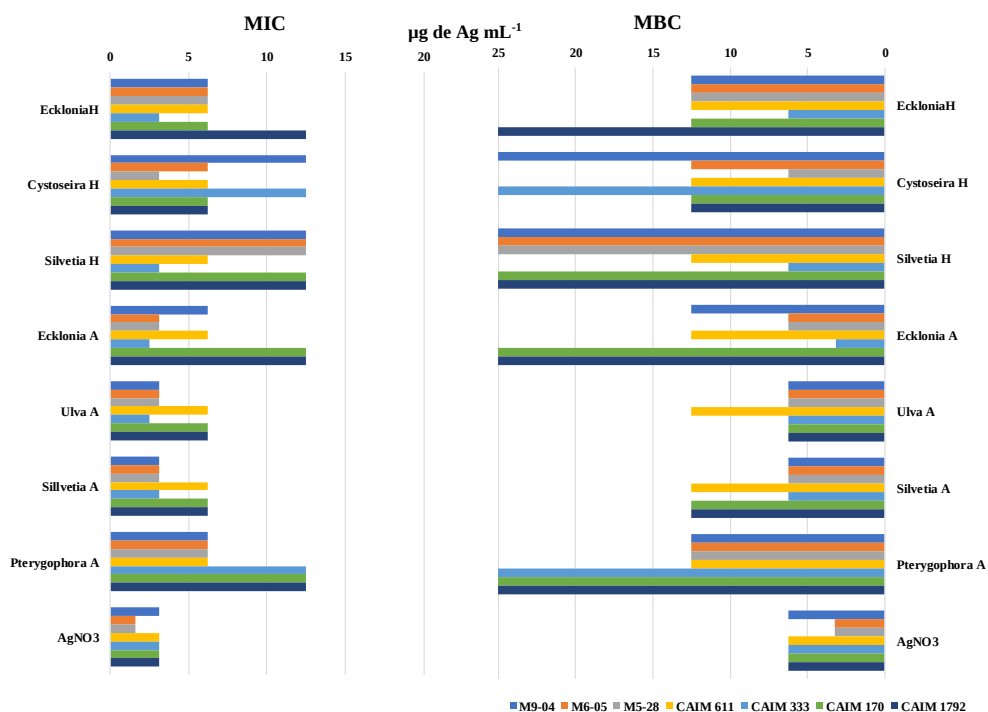


Figura 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) mediante microdilución en placa de AgNPs sintetizadas con extractos de macroalgas mexicanas (H: extracto hidroetanólico; A: extracto acuoso).

Uso de alimentos adicionados con nanopartículas para control de enfermedades

La nanotecnología cuenta con aplicaciones la industria de la acuicultura tales como: tratamiento de aguas, esterilización de estanques, y recientemente como aditivo en alimentos para el control de enfermedades (Vijayan *et al.* 2016; Meneses Márquez *et al.* 2018). En los países asiáticos (India y China) se ha aumentado el uso de nanopartículas en esta industria (FAO, 2010; Meneses Márquez *et al.* 2018) pero en México, los estudios realizados sobre este tema son incipientes. Los primeros estudios reportados del uso de AgNPs (sintetizadas a base de fitoextractos o bacterias) administradas vía dietaria en camarón se centraron en el aprovechamiento de su potencial antimicrobiano para el control de enfermedades ocasionadas por especies de *Vibrio* (Vaseeharan *et al.* 2010; Kandasamy *et al.* 2012; Morales-Covarrubias *et al.* 2016; Sivaramasamy and Zhiwei 2016; Alvarez-Cirerol *et al.* 2019). Las AgNPs se han evaluado en especies de importancia económica como: *Litopenaeus vannamei*, *Feneropenaeus indicus* y *Penaeus monodon* desafiados con cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, *cholerae* o *harveyi* (Tabla 3).

Recientemente, Maldonado Muñiz *et al.* 2019 confirmaron que la vía dietaria es una forma segura y adecuada de administrar AgNPs para evaluar su efecto en los camarones debido a su buena estabilidad y adherencia, reportando por primera vez la medición de pérdidas de la Ag de las NPs por lixiviación en agua marina resultando inferiores al 5%, en este estudio también reporta que la actividad anti-*Vibrio* de las AgNPs no se pierde al adicionarlas en alimentos peletizados para camarón y concluye que su consumo a dosis bajas (menores a 100 AgNPs mg kg⁻¹ de alimento) durante 7 días aumenta significativamente la sobrevivencia hasta en un 78 % en organismos *Litopenaeus vannamei* desafiados por baño con *Vibrio parahaemolyticus* AHPND⁺ (Figura 5), coincidiendo con sobrevivencias reportadas por estudios previos en un rango desde un 70 hasta un 90% (ver referencias en Tabla 3). Por otra parte, existen hallazgos donde se concluye que la plata en forma coloidal también tiene un efecto protector contra *Vibrio parahaemolyticus* AHPND⁺, ya que Morales-Covarrubias y colaboradores en 2016 reportan una sobrevivencia del 90 % en organismos *L. vannamei*

desafiados *Vibrio parahaemolyticus* AHPND+ previamente alimentados con dietas adicionadas plata coloidal comercial.

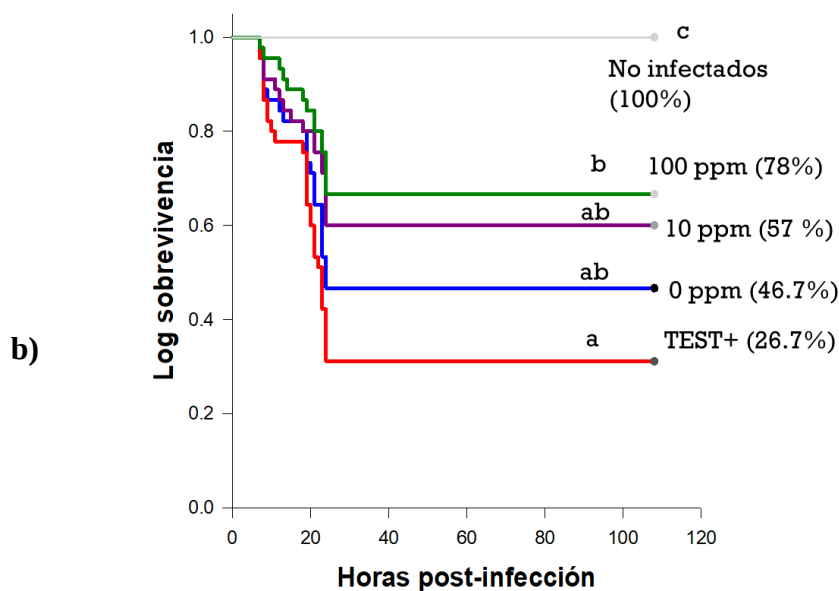


Figura 5. Grafica Log de sobrevivencia Kaplan-Meier y comparación de medias Holm-Sidak ($P < 0.001$) organismos *L. vannamei* desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* (09-04) AHPND+ previamente alimentados con dietas adicionadas con 0, 10 y 100 ppm de AgNPs sintetizadas a base de *Ulva* (Maldonado Muñiz *et al.* 2016).

Tabla 5. Evaluación de alimentos adicionados con nanopartículas para control de enfermedades

Tipo de nanopartículas	Especie en la que se evaluaron	Dosis administrada en alimento	Infección	Sobrevivencia	Referencia
AgNPs (extracto acuoso de <i>Ulva</i>)	<i>Litopenaeus vannamei</i>	100 mg kg ⁻¹ de alimento (7 días)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> causante de AHPND ⁺	78 %	Maldonado Muñiz <i>et al</i> 2019
AgNPs (extracto de <i>Prosopis chilensis</i> L)	<i>Penaeus monodon</i>	0.1 mg de AgNPs en 10 mg de alimento	<i>V. cholerae</i> , <i>V. harveyi</i> , y <i>V. parahaemolyticus</i>	60 %	(Kandasamy et al. 2012)
AgNPs (<i>Camellia sinensis</i>)	<i>Fenneropenaeus indicus</i>	5 y 10 mg AgNPs (5 días)	<i>Vibrio harveyi</i>	70%	(Vaseeharan et al. 2010)
AgNPs (extracto de <i>Rumex dentatus</i>)	<i>Litopenaeus vannamei</i> PL-15	<i>A. franciscana</i> como vector 50 µg/mL de AgNPs	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	87.5 %	(Alvarez-Cirerol et al. 2019)
AgNPs <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	0.1 mg de AgNPs en 10 mg de alimento	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	85.5 %	(Sivaramasamy and Zhiwei 2016a)
Plata coloidal	<i>Litopenaeus vannamei</i>	0.5 ml g ⁻¹ de alimento	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> causante de AHPND ⁺	90 %	(Morales-Covarrubias et al. 2016)

Toxicidad, bioacumulación y cinética de depuración de nanopartículas administradas vía dietaria

En este tema, algunos investigadores han estudiado la bioacumulación y transferencia de metales nobles y pesados, incluida la plata iónica, radiomarcada o compleja en zooplancton, peces y crustáceos con el propósito de establecer el estado actual de acumulación, distribución y migración dentro de la cadena trófica de metales producto de la contaminación en el ecosistema o por la migración ocasionada por el consumo de dietas contaminadas (Metian *et al.* 2010; Wang 2013; Lacave *et al.* 2017). Sin embargo, en camarón se carece de estudios enfocados a proporcionar información sobre la acumulación de los productos antibacterianos de nueva generación fabricados con nanotecnología para promover su uso a dosis apropiadas que tengan un impacto mínimo en los sistemas biológicos.

Se han documentado y adoptado diferentes directrices de ensayos para determinar experimentalmente la bioacumulación en peces e invertebrados. Las que se aplican con carácter más general son la Directriz 305 de la OECD (OECD, 2012) y la guía normalizada ASTM (ASTM 2002), los principios de las ambas directrices son similares y describen un procedimiento normalizado para la evaluación del potencial de bioacumulación y bioconcentración de cualquier sustancia química en peces tras su exposición a través del agua o de la dieta, bajo condiciones definidas bajo un régimen de administración. Generalmente, se trata de un ensayo con peces que consta de dos fases: una de exposición a la sustancia de estudio (absorción) y otra de post-exposición (depuración). Durante la depuración, los peces se transfieren a un medio exento de la sustancia a prueba. La concentración de ésta en el pez deberá determinarse en distintos tiempos de muestreo durante cada una de las fases de ensayo.

Maldonado-Muñiz *et al.* en 2019 reportaron un estudio basado en las recomendaciones de la OECD llevado a cabo en juveniles de *Litopenaeus vannamei* y mencionaron en términos de toxicidad que el consumo a corto plazo (7 días) de alimentos peletizados suplementados con dosis nominales de Ag (AgNPs) (10, 100, 1 000 o 10 000 ppm), no afecta la sobrevivencia,

crecimiento o tasa de conversión alimenticia de los camarones; sin embargo, su consumo en altas concentraciones dietarias (1 000 y 10 000 ppm) disminuye significativamente el índice hepatosomático. Este efecto negativo sobre el HPI, seguido del daño histológico, se ha reportado en truchas después de ocho semanas de exposición en agua con AgNPs comerciales a concentraciones de 3 300 y 1 000 mg de Ag L⁻¹ (Monfared and Soltani 2013).

En términos de bioacumulación y depuración mencionaron que el consumo a corto plazo de AgNPs produjo una bioacumulación significativa de Ag dependiente de la dosis en el hepatopáncreas seguido de la cutícula, mientras que la bioacumulación en el músculo no fue significativa; por otra parte, mencionaron que la asimilación y depuración de Ag es llevada a cabo en mayor parte por el hepatopáncreas, esto debido a que la glándula del hepatopáncreas de los crustáceos es considerado un órgano blanco para la acumulación de muchos tipos de sustancias; además de realizar funciones importantes como secretar enzimas digestivas, servir como el sitio principal para la adsorción de alimentos y almacenar reservas metabólicas, este órgano también contiene vesículas con proteínas de unión a metales que le permiten secuestrar metales pesados y otros tipos de sustancias. Finalmente, la depuración de Ag acumulada en hepatopáncreas y branquias fue de 89 y 99 % respectivamente, después de 14 días de depuración (alimentación con dieta control).

Efecto de nanopartículas sobre histología de camarón

Actualmente, no han sido reportados estudios de toxicidad de AgNPs administradas vía dietaria en términos histológicos para camarón. Los estudios realizados en otros invertebrados (*Daphnia magna*) y en peces (*Danio rerio* y *Rainbow trout*) expuestos por vía acuosa en agua dulce han mostrado un amplio rango de dosis, que van desde 5 ng hasta 100 mg ml⁻¹ definidas como tóxicas las cuales a su vez son dependientes de la especie de prueba y dosis administradas (Bianchini and Wood 2002; Bilberg *et al.* 2012; Monfared and Soltani 2013; Mackevica *et al.* 2015; Yazdanparast *et al.* 2016). La diversidad en los resultados de toxicidad de AgNPs reportados para diferentes organismos es atribuido a diferentes factores ambientales (pH, salinidad), vía de exposición (agua, alimento), y características físicas que

afectan su biodisponibilidad (liberación de iones, tamaño, forma, carga, recubrimiento de las NPs, solubilidad) (Scown *et al.* 2010; Yang *et al.* 2012; Macken *et al.* 2012).

Nuestro grupo de investigación reportó por primera vez la toxicidad en términos de histología en organismos *L. vannamei* después del consumo a largo plazo (20 días) de dietas adicionadas con AgNPs a concentraciones nominales de 0, 10, 100 y 1000 ppm. En las condiciones evaluadas no se afectó la sobrevivencia, el crecimiento, ni el índice hepatosomático del camarón *L. vannamei*. Las dosis altas de hasta 1000 ppm ocasionaron daños histológicos significativos en el HP (ver Figura 6). En base a estos resultados se concluyó que el uso de éstas AgNPs debe restringirse a dosis entre 10 y 100 ppm (Maldonado-Muñiz *et al.* 2015).

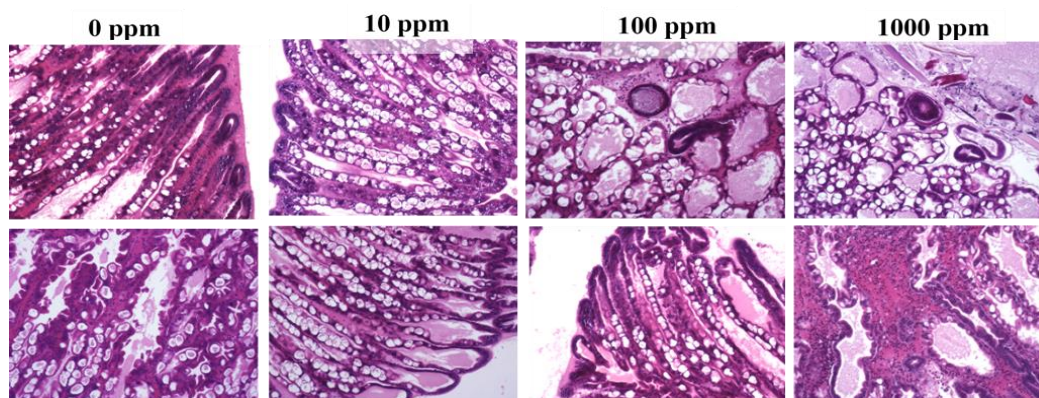


Figura 6. Microfotografía de HP de camarón *L. vannamei* después de 20 días de alimentación con dietas suplementadas con AgNPs.

Influencia del consumo de dietas con AgNPs sintetizadas con extractos de macroalgas sobre la biodiversidad de la microbiota fecal de *L. vannamei*

La metagenómica ha surgido en la última década como una prometedora herramienta que provee información sobre la diversidad del microbioma para obtener una comprensión más profunda sobre roles bacterianos en la salud de los organismos (Martínez-Porchas and Vargas-Albores 2017). El microbioma intestinal desempeña un papel integral en la salud del huésped al estimular el desarrollo del sistema inmune, ayudando en el aprovechamiento de

nutrientes y superando a los patógenos oportunistas (Tarnecki *et al.* 2017). Actualmente, se han reportado estudios donde se confirma que la dieta tiene una influencia directa en la diversidad de la microbiota intestinal del huésped y por consecuencia en la del medio ambiente (Claesson *et al.* 2012; Cornejo-Granados *et al.* 2017; Tarnecki *et al.* 2017). Por otra parte, estudios confirman que el microbioma fecal es un reflejo directo del microbioma intestinal, resultando como una forma de análisis no invasiva para los organismos (Sugita *et al.* 1987; Oetama *et al.* 2016; Zhou *et al.* 2017). Sugita y colaboradores (1987) compararon la microflora fecal de peces dorados y tilapia con la de sus contenidos intestinales y no encontraron diferencias significativas en los recuentos de los principales grupos de bacterias entre los dos tipos de muestras de las dos especies de peces. Con esto concluyeron que las muestras fecales son buenos indicadores de la microflora intestinal del pez.

En el área de la acuicultura es una práctica común el uso de productos que ayuden a mejorar la resistencia contra enfermedades y que a su vez aumenten el rendimiento de producción; dentro de ellos destacan moléculas de origen natural o sintético con poder antimicrobiano y recientemente los probióticos y las partículas nanoestructuradas (Narrowe *et al.* 2015; Sivaramasamy and Zhiwei 2016; Sivaramasamy *et al.* 2017), estos productos son con frecuencia añadidos directamente en el agua o suministrados vía alimentaria (Merrifield *et al.* 2013; Martínez-Porchas and Vargas-Albores 2017; Vargas-Albores *et al.* 2017). Actualmente, existe información sobre la modificación y/o restauración en el microbioma intestinal una vez que moléculas con actividad antibacteriana (p ej. triclosán), nanopartículas y probióticos son administrados vía dietaria en peces (Narrowe *et al.* 2015; Vargas-Albores *et al.* 2017; Adamovsky *et al.* 2018). Sin embargo, la modificación de la microbiota intestinal en camarón debido al consumo nanopartículas no ha sido reportado previamente.

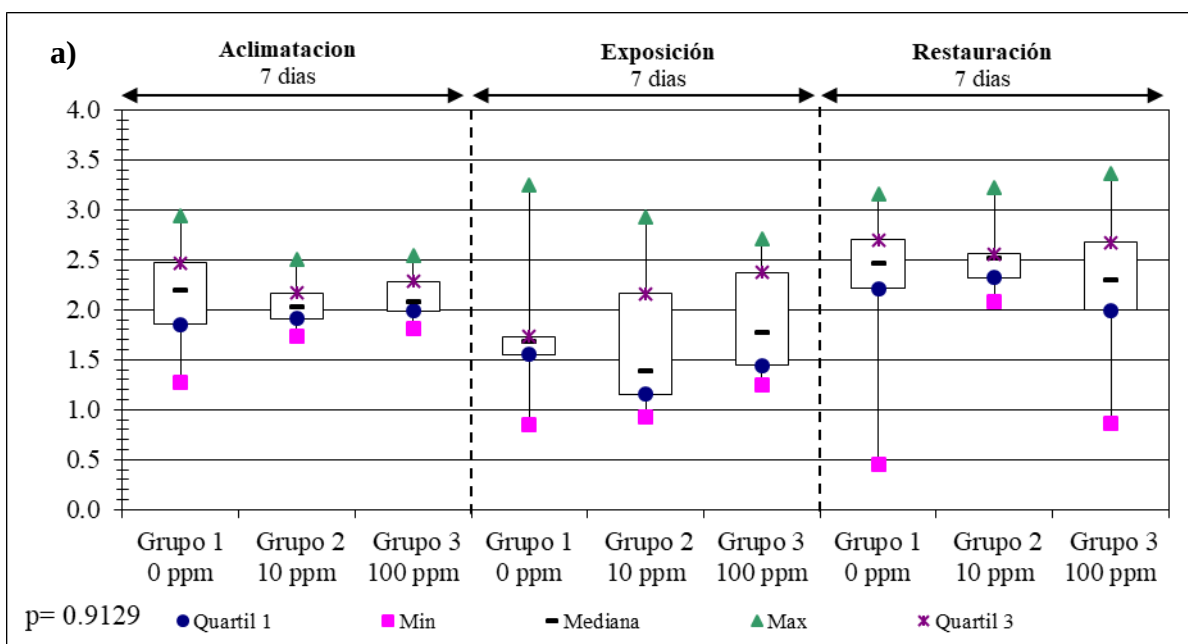
Aunque existen estudios en otros organismos en lo que se ha demostrado que el consumo de nanopartículas de plata puede modificar la microbiota intestinal y que esto depende del tamaño de la nanopartícula, de su forma, del revestimiento y de su composición y dosis (Qiu *et al.* 2018) por ejemplo en el 2014, Han y colaboradores en 2014, utilizan larvas de *Drosophila melanogaster* como modelo de invertebrados para probar el efecto del consumo de AgNP y demuestran que hubo una reducción notable en la diversidad de la microbiota

intestinal de las larvas de *Drosophila* tratadas con Ag NP (500 y 450mg ml⁻¹) con un aumento en el predominio de *Lactobacillus brevis* y una disminución en *Acetobacter* en comparación con el control. Por otro lado Wilding *et al.* (2016), indican que en contraste con los antibióticos de amplio espectro que causan cambios drásticos en el microbioma, la dosificación oral repetida de AgNP (10 mg kg⁻¹ de peso corporal por día) durante 28 días no alteró la estructura o diversidad del microbioma intestinal indígena de murinos independientemente del tamaño (20 y 110 nm) o revestimiento (PVP y citrato) de las nanopartículas, lo cual también puede ser una ventaja ya que los cambios en el microbioma se han relacionado con la iniciación /progresión de muchas enfermedades (Qiu *et al.* 2018). Nuestro grupo de investigación, realizó un estudio preliminar en colaboración con el Dr. Bruno Gómez-Gil del CIAD Mazatlán, con la finalidad de conocer la modificación y restauración del microbioma intestinal a través del análisis de la microbiota fecal del camarón después de suministrar alimentos adicionados con AgNPs; el experimento consistió en 3 fases una de aclimatación (solo dieta control sin AgNPs, 7 días), una de exposición (dietas con AgNPs a 0, 10 y 100 ppm, 7 días) y finalmente una fase de restauración (regreso a dieta control, 7 días), al final de cada fase se colectaron muestras individuales de heces de 10 camarones por tratamiento (1.06±0.56 g peso promedio) y se evaluaron las comunidades microbianas fecales utilizando la secuencia de los fragmentos del gen 16S rRNA.

En este estudio se encontró que el consumo de AgNPs vía dietaria durante la fase de exposición disminuyó ligeramente la diversidad del microbioma fecal en todos los tratamientos incluyendo el control (0 ppm) por lo que es probable que las AgNPs en las dosis de 10 y 100 ppm se lixiviaran en el agua afectando la microbiota en todos los organismos en general; sin embargo, aunque se observó esa tendencia resultó ser no significativa para ningún tratamiento. Por otra parte, también se mostró que al dejar de suministrar las dietas adicionadas con AgNPs la diversidad regresó a los valores iniciales originales (Figura 7a). Al realizar un análisis estadístico alternativo sobre los diferentes bloques de muestreo tomando en cuenta la presencia o ausencia de las AgNPs, se encontraron cambios significativos en las proporciones a nivel orden en *Vibrionales*, *Alteromonadales* y *Burkholderiales* (Figura 7b).

Maldonado-Muñiz, M., Nieto-López Martha Guadalupe, Cruz-Suárez, L.E. 2019. Nanopartículas de Plata como Aditivo en Alimentos para Control de Enfermedades Causadas por *Vibrio* en *L. vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 168-199.

El grupo de bacterias *Vibrionales* han sido reportadas previamente como bacterias gram negativas más abundantes en el intestino de especies de camarón como: *Litopenaeus vannamei*, *Peneaus monodon* y *Fenneropenaeus chinensis*, dentro de este grupo de bacterias gram-negativas han sido reportadas como cepas altamente patógenas para camarón *Vibrio parahaemolyticus*, sin embargo en su mayoría son endógenas y no virulentas con roles funcionales (Wang *et al.* 2014; Cardona *et al.* 2016). El grupo *Alteromonadales*, ha sido reportado como otro de los grupos de bacterias más abundantes de la flora intestinal nativa en camarón utilizado frecuentemente como indicador de “buena salud” en organismos tanto silvestres como en maternidades (Wang *et al.* 2014; Zheng *et al.* 2017). Finalmente, los microorganismos del orden *Burkholderiales* han sido reportados como proteobacterias gram negativas de metabolismo aerobio frecuentemente asiladas de suelo y agua en granjas de peces e intervienen en los ciclos de fijación del carbono y del nitrógeno (Sheu *et al.* 2016).



b)

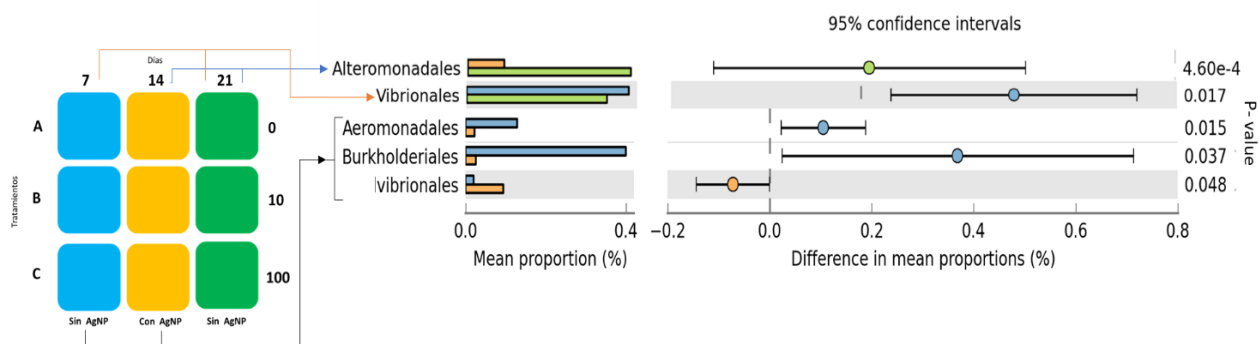


Figura 7 a) Diversidad en el microbioma fecal (índice de Shannon) de organismos *L. vannamei* alimentados con dietas suplementadas con AgNPs (0, 10 y 100 ppm), b) comparaciones de proporciones a nivel orden por bloques de muestreo (sin AgNPs vs con AgNPs)

Conclusiones

La producción de AgNPs con extractos de algas marinas ha tomado auge en los últimos años debido a las características físico-químicas mejoradas con respecto a las sintetizadas químicamente o con otros extractos fitoquímicos; debido a su actividad antibacteriana, para algunos autores resultan ser una estrategia prometedora en la acuicultura contra enfermedades emergentes especialmente las ocasionadas por cepas de *Vibrio*, debido a que presentan una serie de ventajas con respecto a los antibióticos y probióticos; ya que el uso de antibióticos puede tener consecuencias negativas para humanos y salud ambiental, debido a que promueven la transferencia de genes de resistencia y en el caso de los probióticos, aunque resultan ser prometedores su uso tiene algunos riesgos asociados a la introducción de especies no nativas del ecosistema marino.

La aplicación de AgNPs producidas a partir de *Ulva clathrata* en alimentos peletizados a dosis adecuadas (menores a 100 ppm) resulta ser inocuo en términos de toxicidad, histología y bioacumulación para los organismos que las consumen, el uso de estas podría ser un tratamiento efectivo contra enfermedad bacterianas en el cultivo de camarón y por resultado obtener mejores rendimientos de producción.

Por otro lado, los cambios en la microbiota inducidos por el uso de las AgNPs puede ser beneficioso para los camarones, pero un riesgo que también puede ocurrir es que estos cambios afecten a las comunidades microbianas con funciones importantes para estos crustáceos y el ambiente que los rodea.

Aunque actualmente se cuenta con información que respalda los buenos resultados obtenidos en experimentos realizados a nivel laboratorio en medio controlado, es necesario estudios futuros ya que es críticamente importante comprender el efecto de su uso directamente en granjas de camarón enfatizando los beneficios obtenidos y desafíos, así como perspectivas a largo plazo tomando en cuenta las interacciones con el medio ambiente.

Referencias

- Abdel-Raouf N, Al-Enazi NM, Ibraheem IBM (2013) Green biosynthesis of gold nanoparticles using *Galaxaura elongata* and characterization of their antibacterial activity. Arab J Chem. doi: 10.1016/j.arabjc.2013.11.044
- Adamovsky O, Buerger AN, Wormington AM, *et al* (2018) The gut microbiome and aquatic toxicology: An emerging concept for environmental health. Environ Toxicol Chem 37:2758–2775. doi: 10.1002/etc.4249
- Aguirre-Guzmán G, Ruíz HM, Ascencio F (2004) A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. Aquac. Res. 35:1395–1404
- Alvarez-Cirerol FJ, López-Torres MA, Rodríguez-León E, *et al* (2019) Silver Nanoparticles Synthesized with *Rumex hymenosepalus*: A Strategy to Combat Early Mortality Syndrome (EMS) in a Cultivated White Shrimp. J Nanomater 2019:1–15. doi: 10.1155/2019/8214675
- Arockiya Aarthi Rajathi F, Parthiban C, Ganesh Kumar V, Anantharaman P (2012) Biosynthesis of antibacterial gold nanoparticles using brown alga, *Stoechospermum marginatum* (kützing). Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc 99:166–173. doi: 10.1016/J.SAA.2012.08.081
- ASTM (2002) Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. Ecol Res Ser EPA-600/3-75-009 96:61. doi: 10.1520/E0729-96R14.2
- Bianchini A, Wood CM (2002) Physiological effects of chronic silver exposure in *Daphnia magna*. Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol 133:137–145. doi: 10.1016/S1532-0456(02)00088-1
- Bilberg K, Hovgaard MB, Besenbacher F, Baatrup E (2012) In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (*Danio rerio*). J Toxicol 2012:9. doi: 10.1155/2012/293784
- Cardona E, Gueguen Y, Magré K, *et al* (2016) Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. BMC Microbiol 16:1–9. doi: 10.1186/s12866-016-0770-z
- Chinnappan RS, Kandasamy K, Sekar A (2015) A review on marine based nanoparticles and their potential applications. African J Biotechnol 14:1525–1532. doi: 10.5897/AJB2015.14527
- Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, *et al* (2012) Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. Nature 488:178–184. doi: 10.1038/nature11319
- CONAPESCA (2017) Anuario estadístico de acuicultura y pesca. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, Mazatlan, Sinaloa, Mexico. pp 28
https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO_ESTADISTICO_2017.pdf
- Cornejo-Granados F, Lopez-Zavala AA, Gallardo-Becerra L, *et al* (2017) Microbiome of Pacific Whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. Sci Rep 7:1–15. doi: 10.1038/s41598-017-11805-w
- Maldonado-Muñiz, M., Nieto-López Martha Guadalupe, Cruz-Suárez, L.E. 2019. Nanopartículas de Plata como Aditivo en Alimentos para Control de Enfermedades Causadas por *Vibrio* en *L. vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 168-199.

- El-Kassas HY, El-Sheekh MM (2014) Cytotoxic activity of biosynthesized gold nanoparticles with an extract of the red seaweed *Corallina officinalis* on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Asian Pacific J Cancer Prev* 15:4311–4317. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.10.4311
- El Kassas HY, Attia AA (2014) Bactericidal application and cytotoxic activity of biosynthesized silver nanoparticles with an extract of the red seaweed *Pterocladia capillacea* on the HepG2 cell line. *Asian Pacific J Cancer Prev* 15:1299–1306. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.3.1299
- Ganapathy Selvam G, Sivakumar K (2015) Phycosynthesis of silver nanoparticles and photocatalytic degradation of methyl orange dye using silver (Ag) nanoparticles synthesized from *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux. *Appl Nanosci* 5:617–622. doi: 10.1007/s13204-014-0356-8
- Geoprincy G, Saravanan P, Gandhi NN (2011) A novel approach for studying the combined antimicrobial effects of silver nanoparticles and antibiotics through agar over layer method and disk diffusion method. *J Nanomater* 6:1557–1565
- Gomez-Gil B, Soto-Rodríguez S, Lozano R B-LM (2014) Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announc* 2:e00055-14. doi: 10.1128/genomeA.00055-14.Copyright
- Govindaraju K, Kiruthiga V, Kumar VG, Singaravelu G (2009) Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a marine alga, *Sargassum Wightii* Grevilli and their antibacterial effects. *J Nanosci Nanotechnol* 9:5497–5501. doi: 10.1166/jnn.2009.1199
- Han X, Geller B, Moniz K, *et al* (2014) Monitoring the developmental impact of copper and silver nanoparticle exposure in *Drosophila* and their microbiomes. *Sci Total Environ* 487:822–829. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.129
- Jegadeeswaran P, Rajeshwari S, Venckatesh R (2012) Green synthesis of silver nanoparticles from extract of *Padina tetrastrum* leaf. 7:991–998
- Kandasamy K, Alikunhi NM, Manickaswami G, *et al* (2012) Synthesis of silver nanoparticles by coastal plant *Prosopis chilensis* (L.) and their efficacy in controlling vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. *Appl Nanosci* 3:65–73. doi: 10.1007/s13204-012-0064-1
- Kannan RRR, Stirk WA, Van Staden J (2013) Synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Codium capitatum* P.C. Silva (*Chlorophyceae*). *South African J Bot* 86:1–4. doi: 10.1016/j.sajb.2013.01.003
- Krishnamoorthy S, Sudalayandi K, Masilamani D, Prasanna KP (2014) Evaluation of marine macro alga, *Ulva fasciata* against bio-luminescent causing *Vibrio harveyi* during *Penaeus monodon* larviculture. *African J Microbiol Res* 8:803–813. doi: 10.5897/AJMR2013.6233
- Kumar P, Govindaraju M, Senthamilselvi S, Premkumar K (2013a) Photocatalytic degradation of methyl orange dye using silver (Ag) nanoparticles synthesized from *Ulva lactuca*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 103:658–61. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.11.022

- Kumar P, Selvi SS, Prabha a L, *et al* (2012a) Antibacterial Activity and in-Vitro cytotoxicity assay against brine shrimp using silver nanoparticles synthesized. *Dig J Nanomater Biostructures* 7:1447–1455
- Kumar P, Selvi SS, Prabha a L, *et al* (2012b) Synthesis of silver nanoparticles from *Sargassum tenerrimum* and screening phytochemicals for its antibacterial activity. *Nano Biomed Eng* 4:12–16. doi: 10.5101/nbe.v4i1.p12-16.1.
- Kumar P, Senthamil Selvi S, Govindaraju M (2013b) Seaweed-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Gracilaria corticata* for its antifungal activity against *Candida* spp. *Appl Nanosci* 3:495–500. doi: 10.1007/s13204-012-0151-3
- Kumar P, Senthamil Selvi S, Lakshmipraba A, *et al* (2012c) Efficacy of bio-synthesized silver nanoparticles using *Acanthophora spicifera* to encumber biofilm formation. *Dig J Nanomater Biostructures* 7:511–522
- Lacave JM, Fanjul Á, Bilbao E, *et al* (2017) Acute toxicity, bioaccumulation and effects of dietary transfer of silver from brine shrimp exposed to PVP/PEI-coated silver nanoparticles to zebrafish. *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol* 199:69–80. doi: 10.1016/j.cbpc.2017.03.008
- Luna C, Cruz-Suarez LE, Mendoza-Resendez R, Ricque-Marie D, Gonzalez-Dueñas C, Maldonado-Muñiz M (2015) Método de preparación de coloides estables de nanopartículas ultrafinas de plata y partículas policristalinas de Ag/AgCl utilizando extractos de algas del género *Ulva*. Patent Application MX/2015/002621.
- Macken A, Byrne HJ, Thomas K V (2012) Effects of salinity on the toxicity of ionic silver and Ag-PVP nanoparticles to *Tisbe battagliai* and *Ceramecium tenuicorne*. *Ecotoxicol Environ Saf* 86:101–10. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.08.025
- Mackevica A, Skjolding LM, Gergs A, *et al* (2015) Chronic toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna* under different feeding conditions. *Aquat Toxicol* 161:10–16. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.01.023
- Maldonado-Muñiz M, Nieto-Lopez M, Tapia-Salazar M, *et al* (2016) Biosíntesis de nanopartículas con extractos de algas marinas, caracterización y evaluación contra *Vibrio parahaemolyticus* causante de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND / EMS) en camarón blanco *Litopenaus vannamei*. In: Seminarios de investigacion, Posgrado FCB UANL. p Poster
- Maldonado-Muñiz M, Nieto-López M, Tapia-Salazar M, *et al* (2015) Evaluacion toxicologica de alimentos pelletizados para camaron adicionados con nanoparticulas en *L. vannamei*. In: XIV Simposio Internacional en Nutrición Acuicola 2017
- Maldonado-Muñiz M, Carlos Luna, Mendoza-Reséndez R, Barriga-Castro ED, Soto-Rodriguez S, Ricque-Marie D, Cruz-Suarez LE. Silver nanoparticles against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp and their depuration kinetics. *Journal of Applied Phycology*. doi: 10.1007/s10811-019-01948-w

- Martínez-Porchas M, Vargas-Albores F (2017) Microbial metagenomics in aquaculture: a potential tool for a deeper insight into the activity. *Rev Aquac* 9:42–56. doi: 10.1111/raq.12102
- Meneses Márquez JC, Partida AH, Mejía JC, *et al* (2018) Silver nanoparticles applications (AgNPS) in aquaculture. *Int J Fish Aquat Stud* 6:5–11
- Merrifield DL, Shaw BJ, Harper GM, *et al* (2013) Ingestion of metal-nanoparticle contaminated food disrupts endogenous microbiota in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Pollut* 174:157–163. doi: 10.1016/j.envpol.2012.11.017
- Metian M, Hédouin L, Eltayeb MM, *et al* (2010) Metal and metalloid bioaccumulation in the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) from New Caledonia: Laboratory and field studies. *Mar Pollut Bull* 61:576–584. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.06.035
- Mohandass C, Vijayaraj AS, Rajasabapathy R, *et al* (2013) Biosynthesis of silver nanoparticles from marine seaweed *Sargassum cinereum* and their antibacterial activity. *Indian J Pharm Sci* 75:606–10
- Monfared AL, Soltani S (2013) Effects of silver nanoparticles administration on the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histological and biochemical studies. *Pelagia Res Libr* 3:285–289
- Morales-Covarrubias MS, García-Aguilar N, Bolan-Mejía MDC, Puello-Cruz AC (2016) Evaluation of medicinal plants and colloidal silver efficiency against *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* cultured at low salinity. *Dis Aquat Organ* 122:57–65. doi: 10.3354/dao03060
- Murugan K, Benelli G, Ayyappan S, *et al* (2015a) Toxicity of seaweed-synthesized silver nanoparticles against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* and its impact on predation efficiency of the cyclopoid crustacean *Mesocyclops longisetus*. *Parasitol Res* 114:2243–2253. doi: 10.1007/s00436-015-4417-z
- Murugan K, Samidoss CM, Panneerselvam C, *et al* (2015b) Seaweed-synthesized silver nanoparticles: an eco-friendly tool in the fight against *Plasmodium falciparum* and its vector *Anopheles stephensi*. *Parasitol Res* 114:4087–4097. doi: 10.1007/s00436-015-4638-1
- Narrowe AB, Albuti-Lantz M, Smith EP, *et al* (2015) Perturbation and restoration of the fathead minnow gut microbiome after low-level triclosan exposure. *Microbiome* 3:1–18. doi: 10.1186/s40168-015-0069-6
- Oetama VSP, Hennersdorf P, Abdul-Aziz MA, *et al* (2016) Microbiome analysis and detection of pathogenic bacteria of *Penaeus monodon* from Jakarta Bay and Bali. *Mar Pollut Bull* 110:718–725. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.03.043
- OECD (2012), Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185296-en>
- OIE (2014) Antimicrobial use in aquatic animals. In: Aquatic animal health code, Seventeenth. World organisation for animal health, Paris, pp 109–117

- Peña-Rodríguez A, Mawhinney TP, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE (2011) Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. Food Chem 129:491–498. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.04.104
- Petrus EM, Tinakumari S, Chai LC, *et al* (2011) A study on the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of nano colloidal silver on food-borne pathogens. Int Food Res J 18:55–66
- Ponnuchamy K, Jacob JA (2016) Metal nanoparticles from marine seaweeds - A review. Nanotechnol. Rev. 5:589–600
- Prasad TNVK V., Kambala VSR, Naidu R (2013) Phyconanotechnology: synthesis of silver nanoparticles using brown marine algae *Cystophora moniliformis* and their characterisation. J Appl Phycol 25:177–182. doi: 10.1007/s10811-012-9851-z
- Qiu K, Durham PG, Anselmo AC (2018) Inorganic nanoparticles and the microbiome. Nano Res 11:4936–4954. doi: 10.1007/s12274-018-2137-2
- Rai M, Yadav A, Gade A (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnol Adv 27:76–83. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002
- Raja SB, Suriya J, Sekar V, Rajasekaran R (2012) Biomimetic of silver nanoparticles by *Ulva lactuca* seaweed and evaluation of its antibacterial activity. Int J Pharm Pharm Sci 4:3–7
- Rajesh S, Raja D (2012) Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ulva fasciata* (Delile) ethyl acetate extract and its activity against *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. J Biopestic 13:119–128
- Rajeshkumar S, Malarkodi C, Gnanajobitha G, *et al* (2013) Seaweed-mediated synthesis of gold nanoparticles using *Turbinaria conoides* and its characterization. J Nanostructure Chem 3:44. doi: 10.1186/2193-8865-3-44
- Renugadevi K, Venus Aswini R (2012) Microwave irradiation assisted synthesis of silver nanoparticle using *Azadirachta indica* leaf extract as a reducing agent and invitro evaluation of its antibacterial and anticancer activity. 2:5–10
- Roni M, Murugan K, Panneerselvam C, *et al* (2015) Characterization and biotoxicity of *Hypnea musciformis*-synthesized silver nanoparticles as potential eco-friendly control tool against *Aedes aegypti* and *Plutella xylostella*. Ecotoxicol Environ Saf 121:31–38. doi: 10.1016/J.ECOENV.2015.07.005
- Saraniya Devi J, Valentin Bhimba B, Magesh Peter D (2013) Production of biogenic silver nanoparticles using *sargassum longifolium* and its applications. Indian J Mar Sci 42:125–130
- Satish L, Santhakumari S, Gowrishankar S, *et al* (2017) Rapid biosynthesized AgNPs from *Gelidiella acerosa* aqueous extract mitigates quorum sensing mediated biofilm formation of *Vibrio* species—an in vitro and in vivo approach. Environ Sci Pollut Res 24:27254–27268. doi: 10.1007/s11356-017-0296-4

- Scown TM, Santos EM, Johnston BD, *et al* (2010) Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicol Sci* 115:521–534. doi: 10.1093/toxsci/kfq076
- Shanmugam N, Rajkamal P, Cholan S, *et al* (2014) Biosynthesis of silver nanoparticles from the marine seaweed *Sargassum wightii* and their antibacterial activity against some human pathogens. *Appl Nanosci* 4:881–888. doi: 10.1007/s13204-013-0271-4
- Shanthi S, David Jayaseelan B, Velusamy P, *et al* (2016) Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 and their antibiofilm activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*. *Microb Pathog* 93:70–77. doi: 10.1016/J.MICPATH.2016.01.014
- Sheu SY, Li YS, Chen WM (2016) *Piscinibacterium candidicorallinum* gen. Nov., sp. nov., a member of the order *Burkholderiales* isolated from a fish pond. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:5260–5267. doi: 10.1099/ijsem.0.001505
- Singaravelu G, Arockiamary JS, Kumar VG, Govindaraju K (2007) A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. *Colloids Surf B Biointerfaces* 57:97–101. doi: 10.1016/j.colsurfb.2007.01.010
- Singh M, Kalaivani R, Manikandan S, *et al* (2013) Facile green synthesis of variable metallic gold nanoparticle using *Padina gymnospora*, a brown marine macroalga. *Appl Nanosci* 3:145–151. doi: 10.1007/s13204-012-0115-7
- Singh P, Kim YJ, Singh H, *et al* (2015) Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 10:2567–2577. doi: 10.2147/IJN.S72313
- Sivaramasamy E, Zagorsek K, Li F, Xiang J (2017) *In situ* synthesis of silver nanoparticles into TEMPO-mediated oxidized bacterial cellulose and their antivibriocidal activity against shrimp pathogens. *Carbohydr Polym* 166:329–337. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.02.093
- Sivaramasamy E, Zhiwei W (2016) Enhancement of vibriosis resistance in *Litopenaeus vannamei* by supplementation of biomastered silver nanoparticles by *Bacillus subtilis*. *J Nanomed Nanotechnol* 7:1–10. doi: 10.4172/2157-7439.1000352
- Stalin Dhas T, Ganesh Kumar V, Stanley Abraham L, *et al* (2012) *Sargassum myriocystum* mediated biosynthesis of gold nanoparticles. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 99:97–101. doi: 10.1016/j.saa.2012.09.024
- Sugita H, Tsunohara M, Fukumoto M, Deguchi Y (1987) Comparison of microflora between intestinal contents and fecal pellets of freshwater fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53:287–90. doi: 10.2331/suisan.53.287
- Suriya J, Bharathi Raja S, Sekar V, R. R (2012) Biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity using seaweed *Urospora sp.* *African J. Biotechnol.* 11:12192–12198

- Swain P, Sasmal A, Nayak SK, *et al* (2014) Evaluation of selected metal nanoparticles on hatching and survival of larvae and fry of Indian major carp, rohu (*Labeo rohita*). *Aquac Res* 47:498–511. doi: 10.1111/are.12510
- Tarnecki AM, Burgos FA, Ray CL, Arias CR (2017) Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unravelled by metagenomics. *J Appl Microbiol* 123:2–17. doi: 10.1111/jam.13415
- Thangaraju N, Venkatalakshmi RP, Chinnasamy A, Kannaiyan P (2012) Synthesis of silver nanoparticles and the antibacterial and anticancer activities of the crude extract of *Sargassum polycystum* C. Agardh. *Nano Biomed Eng* 4:89–94. doi: 10.5101/nbe.v3i1.p89-94
- Vargas-Albores F, Porchas-Cornejo MA, Martínez-Porchas M, *et al* (2017) Bacterial biota of shrimp intestine is significantly modified by the use of a probiotic mixture: a high throughput sequencing approach. *Helgol Mar Res* 71:. doi: 10.1186/s10152-017-0485-z
- Vaseeharan B, Ramasamy P, Chen JC (2010) Antibacterial activity of silver nanoparticles (AgNps) synthesized by tea leaf extracts against pathogenic *Vibrio harveyi* and its protective efficacy on juvenile *Fenneropenaeus indicus*. *Lett Appl Microbiol* 50:352–356. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02799.x
- Vijayan SR, Santhiyagu P, Ramasamy R, *et al* (2016) Seaweeds: A resource for marine bionanotechnology. *Enzyme Microb Technol* 95:45–57. doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.06.009
- Wang C zhong, Lin G rong, Yan T, *et al* (2014) The cellular community in the intestine of the shrimp *Penaeus penicillatus* and its culture environments. *Fish Sci* 80:1001–1007. doi: 10.1007/s12562-014-0765-3
- Wang WX (2013) Dietary toxicity of metals in aquatic animals: Recent studies and perspectives. *Chinese Sci Bull* 58:203–213. doi: 10.1007/s11434-012-5413-7
- Wilding LA, Bassis CM, Walacavage K, *et al* (2016) Repeated dose (28-day) administration of silver nanoparticles of varied size and coating does not significantly alter the indigenous murine gut microbiome. *Nanotoxicology* 10:513–520. doi: 10.3109/17435390.2015.1078854
- Yang X, Gondikas AP, Marinakos SM, *et al* (2012) Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Sci Technol* 46:1119–1127. doi: 10.1021/es202417t
- Yazdanparast T, Sharifpour I, Soltani M, Esfahani HK (2016) Evaluation of silver retention in different organs of zebrafish (*Danio Rerio*) fed diet supplemented with silver nanoparticles. 5013:269–274
- Yousefzadi M, Rahimi Z, Ghafari V (2014) The green synthesis, characterization and antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from green alga *Enteromorpha flexuosa* (wulfen) J. Agardh. *Mater Lett* 137:1–4. doi: 10.1016/j.matlet.2014.08.110
- Zheng Y, Yu M, Liu J, *et al* (2017) Bacterial community associated with healthy and diseased Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and rearing water across different growth stages. *Front Microbiol* 8:1–11. doi: 10.3389/fmicb.2017.01362

Zhou Y, Zhang D, Peatman E, *et al* (2017) Effects of various levels of dietary copper supplementation with copper sulfate and copper hydroxychloride on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* performance and microbial communities. *Aquaculture* 476:94–105. doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2017.04.016

Página Web:

Sinaloa y Sonora, con el mayor desarrollo de camarón en cautiverio - Política - La Jornada.
<https://www.jornada.com.mx/ultimas/politica/2019/02/14/industria-del-camaron-fundamental-para-economia-de-mexico-2788.html>. Accessed 4 Nov 2019.

Variación del Metabolismo de los Peces Debido al Alimento en Sistemas Acuícolas (Revisión)

Samuel López-Tejeida, Juan Fernando García-Trejo, Leticia Félix-Cuencas y
Maribel Villegas-Villegas

División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de
Querétaro Querétaro, México

Autor por Correspondencia: Juan Fernando García-Trejo (fernando.garcia@uaq.mx)

Resumen

Hoy en día la acuicultura solventa una gran cantidad del pescado para consumo humano; de acuerdo a pronósticos a futuro la acuicultura seguirá creciendo, por tal motivo se tiene que solventar la fuente de proteína para alimentar a los peces cultivados en la acuicultura, ya que actualmente los alimentos comerciales su fuente de proteína es la harina de pescado, dicha fuente de proteína se está encareciendo, lo que provoca el incremento del precio. Actualmente se están realizando estudios en la búsqueda de fuentes alternas de proteína provenientes de cereales o insectos, algunas de estas fuentes alternas no pueden reemplazar completamente a la harina de pescado debido a que contienen algunos antinutrientes lo que provoca que los peces no asimilen completamente los aminoácidos e inclusive impidan la absorción de otros nutrientes. Una manera de probar si los peces realmente están absorbiendo los nutrientes es haciendo una respirometría la cual consta de medir el oxígeno disuelto inicial y el oxígeno final después de cierto tiempo, durante este tiempo el pez se encuentra completamente aislado en la cámara respirométrica. Además del oxígeno disuelto también se obtienen otros factores relacionado con el metabolismo del pez los cuales son la tasa metabólica estándar (SMR), el alcance metabólico aeróbico (AMS), tasa máxima metabólica (MMR) y consumo de oxígeno (MO_2).

Palabras clave: metabolismo, pez, alimentación

Abstract: Nowadays aquaculture solves a large amount of fish for human consumption; According to future forecasts, aquaculture will continue to grow, for this reason the source of protein has to be solved to feed the fish grown in aquaculture, since commercial food is currently the source of protein is fishmeal, said source of protein is becoming more expensive, which causes the price increase. Studies are currently being carried out in the search for alternative protein sources from cereals or insects, some of these alternative sources cannot completely replace fishmeal because they contain some antinutrients, which causes fish to not fully assimilate amino acids and they even prevent the absorption of other nutrients. One way to test if the fish is really absorbing nutrients is to perform a respirometry which consists of measuring the initial dissolved oxygen and the final oxygen after a certain time, during this time the fish is completely isolated in the respiratory chamber. In addition to dissolved oxygen, other factors related to fish metabolism are also obtained, which are the standard metabolic rate (SMR), aerobic metabolic range (AMS), maximum metabolic rate (MMR) and oxygen consumption (MO_2).

Introducción

La acuicultura puede ser definida como la crianza o cultivo de organismos acuáticos utilizando técnicas diseñadas para aumentar la producción de dichos organismos más allá de la capacidad natural del entorno (Justino *et al.*, 2016), aunado a lo anterior la acuicultura a nivel mundial contribuye con el 47% del pescado para consumo humano (Dayson *et al.*, 2016). También la acuicultura es la industria de producción animal con la tasa de crecimiento más alta en los últimos 20 años (Dantas *et al.*, 2017), en 2016 la producción acuícola global fue de 110.2 millones de toneladas, a nivel económico significó 243.5 mil millones de dólares (FAO, 2018). Otro aspecto importante de la acuicultura es que se considera ampliamente como una opción para combatir el hambre y la pobreza en los países en desarrollo (Lithgow *et al.*, 2017). Una de las actividades más importantes en la acuicultura es la nutrición, por lo tanto, el 40% de los costos totales de producción son inversiones en alimentos para peces; si esta tarea tiene ineficiencias, será una pérdida, especialmente para los acuicultores intensivos (Zhou *et al.*, 2017).

Un elemento de gran importancia en los sistemas biológicos es el nitrógeno, este es un componente fundamental de los aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. El catabolismo de estos compuestos que contienen nitrógeno libera amoníaco, que es tóxico y debe de eliminarse. Los peces al consumir los aminoácidos presente en el alimentos los digieren para obtener proteínas, la cantidad de aminoácidos que consume el pez para el crecimiento y desarrollo exceden de los que necesita, por tal motivo se degrada ya que este exceso no se puede almacenar, por último la mayoría de los aminoácidos se catabolizan en el hígado (Ip y Chew, 2018a).

Medición del metabolismo en peces

El metabolismo de los peces dulceacuícolas puede variar dependiendo de las variables físicas y químicas del agua, en el caso del pH el rango óptimo es 6.5 – 9.0, este rango puede variar dependiendo de los compuestos carbonatados presentes en el agua (Mohammadi *et al.*, 2019). En el caso de la temperatura los rangos óptimos pueden variar dependiendo de la

especie que se está cultivando pero este puede ser de 24°C – 30°C (Li, 2017) y el Oxígeno Disuelto (OD) se considera de 6 mg/L (Meng et al., 2019). En el caso del OD como lo menciona (Abdel-Tawwab *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019) la tasa del consumo de oxígeno se puede usar como un parámetro básico para evaluar las actividades metabólicas y a su vez el cortisol es el principal corticosteroide que comúnmente se utiliza como indicador de estrés en peces. Además la concentración de OD en los estanques de peces puede variar debido a muchos factores, como la fotosíntesis, la difusión del O₂, la solubilidad del O₂ en el agua de los estanques todo esto se debe de tomar en cuenta para evitar una hipoxia (Abdel-Tawwab *et al.*, 2019). También la concentración de OD está fuertemente determinada por los procesos de tratamiento de agua, como intercambio de agua, biofiltración, aireación, oxigenación, velocidad de flujo (Yang *et al.*, 2019). También en los peces se pueden presentar el estrés oxidativo que resulta cuando los oxidantes exceden a los antioxidantes lo cual conducen al desequilibrio redox y daño a biomoléculas. Los principales procesos que rigen los niveles de oxidantes en los sistemas biológicos son la tasa de producción y eliminación (Okoye *et al.*, 2019). Continuando con la idea en bajas concentraciones de oxígeno el excremento del pez juega un papel de mayor importancia debido al deterioro de dicho excremento ya que conforme el agua se va deteriorando afectara seriamente el rendimiento y la calidad de los organismos acuáticos. Si la falta de oxígeno llega a tiempos muy prolongados el agua tendrá una gran cantidad de sustancias tóxicas que podrían causar enfermedades o incluso muerte de peces (Ren *et al.*, 2018; Ta y Wei, 2018). En otras palabras la concentración apropiada de oxígeno disuelto promueve el crecimiento biológico, acorta el ciclo de reproducción y mejora la eficiencia del sistema mejorando la economía, otra cuestión de gran importancia son los microorganismos presentes en el agua lo cuales deben de tener una relación simbiótica con la especie cultivada ya que algunos de estos microorganismos son aeróbicos o anaeróbicos, lo cual implica que si hay un desequilibrio propiciara un consumo extra de OD (Ta y Wei, 2018). La importancia del OD es tal que el nivel de OD debe ser superior a 5 mg/L durante 16 h de las 24 h, el tiempo restante no debe de ser inferior a 3 mg/L, ya que si este es inferior a 3 mg/L tendrá un gran impacto en la alimentación, digestión y por ende en la salud de los peces (Huan *et al.*, 2018).

Hay casos en que los peces pueden adoptar la respiración de aire como una respuesta adaptativa para vivir en hábitats acuáticos donde el PO_2 disuelto es bajo. En ocasiones varios de estos tiene branquias degeneradas pero compensadas con órganos respiratorios accesorios, para reducir la pérdida de O_2 absorbido por los órganos que respiran aire al agua hipoxica; esto podría modificar el crecimiento y las excreciones de amoníaco (Ip y Chew, 2018b). En cuanto a las enfermedades o infecciones que se presentan en los peces que se encuentran en estado de estrés y choques térmicos, presentan bajo consumo de OD y amoníaco alto (Cheng-Sheng *et al.*, 2015).

El consumo de oxígeno puede ser utilizado para medir la tasa de respiración del pez, por tal motivo la tasa de respiración se usa comúnmente como una medida para la tasa metabólica (Magnhagen *et al.*, 2018). Para esto se utiliza una metodología llamada respirometría, la cual es una herramienta comúnmente utilizada para medir las tasas de consumo de oxígeno (MO_2) y estimar el rendimiento metabólico de un pez en reposo, durante la exposición a estresores o mientras se realizan diferentes actividades locomotoras. De aquí los parámetros de gran importancia son la tasa máxima metabólica (MMR) esta representa la cantidad máxima de energía que se puede metabolizar aeróbicamente por un pez y puede ser estimada midiendo el MO_2 de los peces durante o después de una actividad exhaustiva; otro parámetro el cual se puede obtener es la tasa metabólica estándar, dicho parámetro es la mínima cantidad de energía requerida para mantener el funcionamiento de pez. La diferencia entre el $\text{MO}_{2\text{Max}}$ y $\text{MO}_{2\text{Min}}$ es el total para la actividad aeróbica en otras palabras la capacidad del metabolismo aeróbico (Christensen *et al.*, 2018; Rummer *et al.*, 2016). También se toma en consideración la tasa metabólica estándar (SMR) y el alcance metabólico aeróbico (AMS), el primero es la tasa metabólica en reposo, en otras palabras es el costo o la cantidad de oxígeno que requiere el pez para solventar las funciones de crecimiento y reproducción; el segundo expresa la tasa metabólica cuando el pez se encuentra a su máxima velocidad de nado (Murray *et al.*, 2017; Rosewarne *et al.*, 2016). (J. Ma *et al.*, 2019) hacen la mención de también tomar en cuenta la tasa de excreción de dióxido de carbono (CR) y el cociente respiratorio (RQ), ya que también están asociados con cambios en la tasa metabólica. Este tipo de experimentos también tiene variaciones como es el periodo de descanso, es decir el tiempo en el cual el pez está dentro de la cámara, este puede variar de 1 a 48 h de duración con el objetivo de que el

pez llegue a la tasa estándar de metabolismo, dicho periodo en la cámara debe de ser suficiente para que los peces se ajusten a estar dentro de la cámara respirométrica, a su vez también se tiene que tomar en cuenta el ciclo circadiano del pez (Snyder *et al.*, 2016). La diversidad de los métodos utilizados está aumentando a medida en que la comunidad científica se interesa en el estudio del metabolismo de los animales; generalmente el MO_2 en reposo se mide típicamente en respirómetros estáticos de flujo intermitente, ya que no se requiere que los peces naden para mantener la posición en la columna de agua, por lo tanto debe de presentar bajo consumo de oxígeno. Alguno de estos respirómetros se les implementa un mecanismo para mezclar el agua que se encuentra dentro de la cámara y conseguir un nivel promedio de oxígeno (Rodgers *et al.*, 2016). Otros experimentos que se realizan con los respirómetros de flujo continuo en los cuales se mide el consumo de oxígeno cuantificando la diferencia entre la entrada y la concentración de oxígeno de salida, se ajusta el flujo de agua a través de respirómetro para mantener una cierta diferencia de oxígeno. Posteriormente el consumo de oxígeno se calcula como el producto del flujo de agua a través del respirómetro por unidad de tiempo y la diferencia en la concentración de oxígeno del agua que ingresa y el agua que sale del respirómetro (Svendsen *et al.*, 2016).

En cuanto a tipos de respirómetros hay varios como: (Nahrgang *et al.*, 2019) utilizaron un respirómetro equipado con ocho cámaras con un volumen de 573 ml de la marca Loligo® Systems Dinamarca (Figura 1). Para medir el oxígeno se utilizó una sonada de inmersión de fibra óptica de polímero, dichas mediciones se realizaron el día anterior a la alimentación, el consumo de oxígeno se registró durante 24 h para evaluar el tiempo necesario para alcanzar el metabolismo de rutina. El consumo de oxígeno disminuye típicamente exponencialmente en el transcurso de las primeras 3 h y el consumo promedio de oxígeno entre 2.5 h y 3 h fue utilizado para el análisis de datos.



Fig 1. Cámara Horizontal

Fuente: <https://www.loligosystems.com>

En el caso de (Magnhagen *et al.*, 2018) utilizaron un túnel de nado de 30 L SW10150 Loligo® con un tamaño de cámara de 55 x 14 x 14 cm, además utilizaron un control de velocidad y un motor externo para ajustar el agua, después de hacer ciertas pruebas se ajustó el flujo de prueba a 1.6 longitudes de cuerpo por segundo. Por tal motivo el pez tuvo que estar en dicho flujo durante 60 min, posteriormente se midió el oxígeno y la temperatura, utilizando una sonda de oxígeno de fibra óptica. Por otra parte (Kamalam *et al.*, 2019) utilizaron la respirometría estática como la mejor herramienta para hacer las mediciones del consumo de oxígeno en peces. Para esto utilizaron una cámara rectangular que podía contener a los peces herméticamente, además dentro de dicha cámara se tenía una sonda de OD basada en un sensor óptico HQ40d HACH® Figura 2, la capacidad de la cámara era de 475 ml, se tomó en cuenta la masa del pez y el volumen del agua. Antes de iniciar con el experimento se realizó el procedimiento pero sin pez para cuantificar la concentración de oxígeno debido a la respiración microbiana; las lecturas con los peces se realizaron por 10 minutos en intervalos de 2 min.



Fig. 2. HACH® HQ40d

Fuente: <https://www.hach.com>

Por otro lado (Ern y Esbaugh, 2018) estimaron las tasa de consumo de oxígeno (MO_2) por medio de una respirometría de flujo intermitente Logigo® Systems; el MO_2 fue calculado por medio de la disminución de PO_2 durante el periodo en que el pez se encontraba en la cámara.

$$MO_2 = \frac{\delta[O_2] \times (V_{cámara} - BM)}{BM} \quad (1)$$

Por medio de Ec. (1) se puede obtener la tasa de consumo ($mgO_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$), $\delta[O_2]$, es la pendiente de la disminución de la concentración de oxígeno en el agua ($mg/L \text{ h}^{-1}$) durante el periodo de encierro, $V_{cámara}$ es el volumen de la cámara de respiración (L), BM es la masa corporal del pez (Kg). La frecuencia de la medición del oxígeno fue de 1 s^{-1} .

(Giacomin *et al.*, 2019) ocuparon frascos de vidrio de 1 L, cubiertos con plástico oscuro, cubiertos con una malla fina y equipados con tubos finos para la aireación. En este caso los intervalos de muestreo fueron 0, 3 y 6 h, primero se obtuvo la medición del valor inicial de PO_2 para esto se utilizó un medidor de O_2 portátil Accumet AP84 Fisher® Scientific, posteriormente pasando el intervalo se obtuvo la medición de fina de PO_2 . (Mohammadi *et al.*, 2019) usaron un respirómetro sin flujo hecho de acrílico con capacidad de 3.2 L, el agua del respirómetro se pasó a través de una cubeta la cual contenía una sonda galvánica conectada a un medidor de OD WTW® Oxical, modelo 3205 para medir la disminución en el nivel de O_2 debido al metabolismo de los peces, además se utilizaron lámparas de 15W y

el respirómetro se cubrió de negro, el consumo de O₂ de acuerdo a la masa se obtiene con la Ec. (2)

$$MO_2 = \frac{(V_r - V_f) \times \Delta O_2}{\Delta t \times M_f} \quad (2)$$

Donde MO₂ es el consumo de O₂ expresado en (mg kg⁻¹ h⁻¹), V_r es el volumen del respirómetro (L), V_f es el volumen del pez (L) este se asume con el peso del pez, ΔO₂ es el cambio en la concentración de O₂ en el respirómetro (mg L⁻¹), Δt es la duración del tiempo (h) y M_f es el peso del pez (Kg).

(Rodgers *et al.*, 2019) determinaron el consumo de oxígeno rutinario (MO₂Routine) y consumo máximo de oxígeno (MO₂Max), para esto utilizaron un respirómetro de 3.33 L, posteriormente se sumergió en un baño de agua para permitir el que los peces se adaptaran a la cámara, posteriormente la cámara se selló y las concentraciones de oxígeno se monitorearon durante 30 – 40 min para determina el O₂ rutinario, para la medición del oxígeno se utilizó un sensor Firesting®.

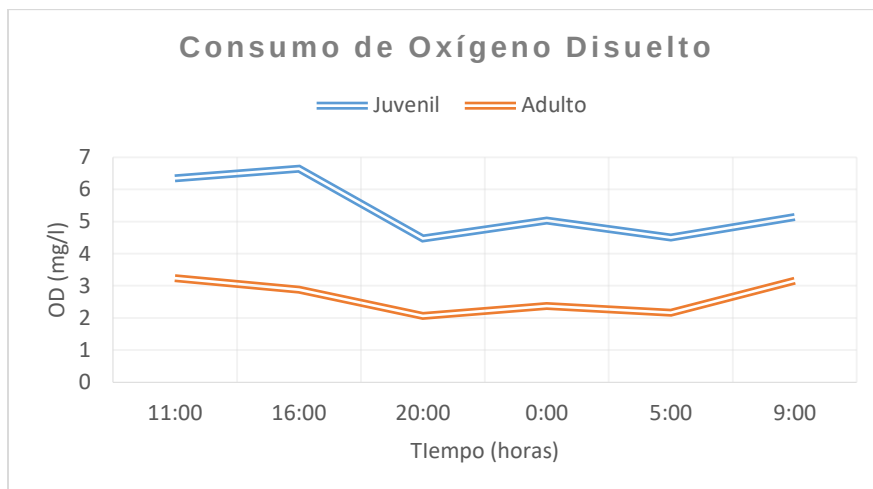
(Christensen *et al.*, 2018) las mediciones de MO₂ se llevaron a cabo con un experimento de flujo intermitente, en bucles de 15 min, que consisten en una período de descarga de 240 s, un periodo de espera de 60 s y un periodo de medición de 600 s. Posteriormente que se colocó un pez en el respirómetro, este se mantuvo a 0.5 BL s⁻¹ hasta que su MO₂ alcanzo un estado estable. Después se inició un protocolo Ucrit comenzando en 0.5 BL s⁻¹ y una velocidad de nada que aumente en 0.5 BL s⁻¹ cada 45 min, el experimento fue terminado cuando el pez descansó su cola en la rejilla trasera por más de tres segundos; Ucrit es:

$$U_{crit} = U_i + U_{ii} \frac{t_i}{t_{ii}} \quad (3)$$

De la Ec. (3) U_i es la última velocidad de nado que completo el pez (BL s⁻¹); U_{ii} es el incremento (BL s⁻¹), t_i es el tiempo que el pez soportó a la última velocidad (s) y t_{ii} es el tiempo prescrito para una (s) velocidad de nado (s).

En la Gráfica 1 se muestra el consumo de oxígeno disuelto mostrado en una respirometría sin flujo realizada en el Campus Amazcala de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, dichas mediciones se realizaron cada cuatro horas, tomando la

medición de oxígeno inicial y final, posteriormente se renovó completamente el agua, hasta cumplir las 24 horas. Lo anterior se hizo con peces de la especie Tilapia utilizando dos tallas.



Gráfica 1. Consumo de Oxígeno Disuelto en Tilapia

Variación del metabolismo debido a la harina de pescado.

La alimentación en los peces funge como regulador de muchas funciones fisiológicas, en particular la regulación del estrés, fisiología y compartimiento, un ejemplo de esto son los aminoácidos los cuales son los constituyentes de las proteínas (Wang *et al.*, 2019); a su vez los alimentos para acuicultura están formulados con un vasto conjunto de ingredientes que cuando se alimenta el animal, dichos ingredientes deben de satisfacer las necesidades nutricionales para realizar sus funciones, además de las antes mencionadas una de gran importancia es el mantenimiento del sistema inmunitario natural, además para garantizar que los nutrientes de la dieta sean ingeridos, digeridos, absorbidos y transportados a las células, se utilizan aditivos alimentario no nutritivos como aglutinantes de pellets, antioxidantes y conservantes de alimentos (Encarnação, 2016). Una de las sustancias más abundantes en la vida, de los organismos y las células son las proteínas, todas las proteínas están formadas por 20 aminoácidos diferentes que están unidos por diferentes enlaces covalentes (enlaces peptídicos), a su vez hay cadenas de dos o más aminoácidos unidos por dicho enlace covalente para así formar polipéptidos. Los 20 aminoácidos son alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina,

lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina (Cheng-Sheng *et al.*, 2015). Uno de los primeros pasos en la alimentación de los peces es la definición del requerimiento óptimo de proteína en la dieta de una especie dada o un stock genético para la definición de los requerimientos nutricionales (R. Ma *et al.*, 2019). La mayoría de los alimentos acuícolas se producen utilizando especies acuícolas y la producción acuícola intensiva emplea sobre todo la harina de pescado de alta calidad y aceite de pescado como ingredientes dietéticos principales (Magalhães *et al.*, 2017). La razón por la cual se utiliza la harina de pescado y parece un ingrediente inevitable en la formulación de alimento para peces es debido a su alto contenido proteico, perfil equilibrado de aminoácidos, alta digestibilidad, palatabilidad y como fuente de ácidos grasos esenciales (Ngugi *et al.*, 2017). La fuente de la harina de pescado que se usa en la alimentación de los peces generalmente son peces pequeños, pescado de residuos picados, trozos de carne, granos, harinas de plantas y harinas de pescado, otra característica importante a tener en cuenta es que dependerá del tipo de pescado serán los requerimientos nutricionales (Boyd, 2013). A su vez la calidad de la harina de pescado depende de las especies industriales antes mencionadas, además también la calidad influirá debido al método de pesca aplicado, el tipo de materia prima incluida como pescado entero o subproductos de procesamiento de captura secundario, la frescura de la materia prima y el método de procesamiento de la harina de pescado, lo cual puede variar considerablemente entre los proveedores y la época del año (Sedigh *et al.*, 2018).

La demanda de harina de pescado a nivel mundial ha excedido en gran cantidad la oferta en las últimas décadas, por tal motivo es factible el uso de ingredientes proteicos alternativos para la sostenibilidad de la acuicultura en el futuro. Algunas alternativas son las proteínas vegetales como la harina de soya, harina de gluten de maíz, semilla de algodón, han sido ampliamente recomendadas debido al bajo costo, una de las características importantes que se busca al reemplazar la harina de pescado es que no se compromete el rendimiento de los animales (Ye *et al.*, 2019). El adoptar alternativas al uso de aceites de pescado que las que se usan para las harinas de pescado se ha incrementado en atención debido al precio de la harina de pescado (Glencross, 2016). Lo anterior lo fundamentan la gran cantidad de estudios para evaluar el reemplazo de la harina de pescado en dietas para tilapia y con esto reducir el costo (Koch *et al.*, 2016); tal interés por dicho reemplazo ha crecido dramáticamente en los últimos

años, los candidatos para reemplazar a la harina de pescado como fuente de proteína son, las proteínas derivadas de plantas, bacterias y levaduras (Dossou *et al.*, 2018). También los cereales son una opción de gran importancia para suplir la demanda de harina de pescado debido a que están altamente disponibles en el mercado a nivel mundial a precios bajos y tienen una composición estable, sin embargo el principal componente nutritivo de los cereales es el almidón y el pescado particularmente las especies carnívoras no pueden usar el almidón de manera eficiente. La utilización del almidón por el pescado también puede verse afectada por el origen botánico, como proporción de amilosa y amilopectina dentro del gránulo de almidón (Couto *et al.*, 2016).

La harina de soya se ha identificado como una fuerte reemplazo para la harina de pescado debido a su composición nutricional compatible, debido al perfil equilibrado del contenido de aminoácidos, también debido a la disponibilidad generalizada y al bajo costo (Biswas *et al.*, 2019). Otras características de la harina de soya es que es una de las fuentes más prometedoras para el remplazo de la harina de pescado y el contenido de proteína es altamente digestible (Hyacinth *et al.*, 2019). En el caso de los insectos la larva de mosca soldado negra (*Hermetia illucens*) es una especie la cual podría ser utilizada para la alimentación animal, lo anterior sobre todos a su capacidad para convertir el desperdicio de alimento vegetales, frutas o desechos industriales en proteínas de alta calidad, además el uso también de la misma larva como fuente de proteína debido a las altas cantidad de proteína 40% en peso seco y además tiene un perfil bien equilibrado de aminoácidos esenciales (Belghit *et al.*, 2019). Algunas de las ventajas por las cuales se utilizan los insectos son se puede reproducir fácilmente, no requieren de superficies grandes para realizar tal acción, utilizan residuos biológicos, lo que significa que se tiene un mayor rendimiento por hectárea en comparación con cultivo comunes, por ultimo produce una emisión más baja de gases de efecto invernadero y amoniaco por Kg de carne en comparación con cerdos o ganado (Munekata y Zhu, 2019).

Pero el reemplazo de la harina de pescado con fuentes alternas tienen también desventajas como lo menciona (Collins P Duodu *et al.*, 2018); en estudios realizados con dietas con suplementos de harina de pescado se observó una bajo rendimiento en crecimiento causado por una mala digestibilidad y una posible menor ingesta de alimento. Los anti nutrientes son

compuestos endógenos presentes de forma natural en las mezclas de vegetales, estos generalmente tiene efectos negativos sobre la ingesta de alimento para los animales, provocando problemas como falta de crecimiento, digestibilidad y la mala utilización de los nutrientes (Kokou y Fountoulaki, 2018). Algunos antrínutrientes encontrados en dichos substitutos de harina de pescado son inhibidores de tripsina, lecitinas, factores bocio génicos, ácido fítico, factores raquitógenos, saponinas (Krogdahl *et al.*, 2020), también taninos, fitato, fosfol, oxalato anti vitaminas, mico toxinas (Collins P. Duodu *et al.*, 2018); incluyen también fibras e indigestos polisacáridos sin almidón (Kokou y Fountoulaki, 2018). Por su parte (Gerile y Pirhonen, 2017) menciona que es de gran importancia saber si el uso de proteínas vegetales en los alimentos para peces carnívoros afecta el rendimiento en cuanto a nado y el MO_2 . En cuanto a los ANF's o aminoácidos limitantes primarios se encuentra la metionina el cual es un nutriente especial en la nutrición de los peces, este se encuentra en los alimentos reducidos a base de harina de pescado; dicho aminoácido participa en procesos fisiológicos claves, como la síntesis de compuestos de azufre como taurina, que es abundante en los organismos acuáticos y este ha sido el foco de varios estudios de nutrición de peces principalmente en el contexto de remplazo de harina de pescado con fuente de proteínas vegetales (Garcia-organista *et al.*, 2019).

(Gu *et al.*, 2018) mencionan que hay pocas investigaciones disponibles para encontrar el mecanismo molecular del metabolismo de la glucosa y los lípidos causados por la sustitución del aceite vegetal. Para esto la insulina tiene un papel de gran importancia ya que regula muchos procesos fisiológicos como carbohidratos, lípidos, crecimiento celular y supervivencia.

Tabla 1. Factores anti nutricionales presentes en el material de alimentación vegetal más utilizado.

Antinutriente	Pienso	Procesando para reducir sus niveles
Proteasa	Guisantes, frijoles, trigo, maíz, soja, harina de colza, harina de girasol, trigo, gluten, concentrado de proteína de soja, proteína de harina de guar	Tratamiento térmico
Lectinas	Harina de soja	Tratamiento térmico, adición de sales
Alergenos	Harina de soja, concentrado de proteína de soja, lupinos	Extracción alcohólica
Ácido fítico	Guisantes de campo, frijoles, trigo, maíz, harina de soja, harina de colza, gluten de trigo, concentrado de proteína de soja, concentrado de proteína de guisante	Fresado, adición de fosfato, tratamiento con fitasa, tratamiento térmico
Saponinas	Harina de soja, concentrado de proteína de guisante	Hidrólisis ácida o alcalina, fermentación microbiana, extracción de alcohó
Polifenoles	Guisantes de campo, frijoles, trigo, maíz, harina de soja, harina de colza, harina de girasol, harina de gluten de maíz, concentrado de proteína de soja, concentrado de proteína de guisante, altramuces	Extracción de alcohol, fermentación microbiana.
Alcaloides	Altramuces	Extracción acuosa, extrusión
Glucosinolatos	Harina de colza	Tratamiento enzimático (mirosinasa), tratamiento térmico, acuoso, extracción
Oligosacáridos	Guisantes de campo, frijoles, harina de soja, concentrado de proteína de soja	Extrusión, extracción acuosa o alcohólica.
Polisacáridos sin almidón	Guisantes de campo, frijoles, harina de soja, concentrado de proteína de soja, proteína de guisante concentrado	Tratamiento enzimático, fermentación, extrusión.
Gosipol	Proteína de harina de semilla de algodón	Extracción con disolvente polar acidificado, genético. modificación de plantas de semillas de algodón ("sin glándulas")

Nutrientes excretados debido a la proteína

La proteína es el componente principal del musculo del pescado y es la fuente de excreción de nitrógeno. La proteína al ser ingerida por el pez se digiere en el estómago y se absorbe en el intestino como aminoácidos y péptidos. Estos se usan para crecimiento muscular, producción de energía o ambos dependiendo sobre la condición del pez y la composición de la alimentación. Cuando la proteína se metaboliza los productos finales son nitrógeno inorgánico, CO₂ y agua. Posteriormente dicho nitrógeno inorgánico se liberará ya sea como amoniaco (NH₃). Una característica importante de la proteína es que si completamente esta fuese digerible por el pez, todo sería absorbido por el pez y las heces no contendrían proteínas. Pero en algunos la proteína en el alimento es indigesta y por lo tanto el pez excreta heces como nitrógeno orgánico (Lekang, 2013). Como ya se mencionó anteriormente la dieta agrega proteínas, una parte las asimilan, otras no y las arrojan al ambiente en forma de

desechos (Valenti *et al.*, 2018). El compuesto principal que se encuentra en la proteína es el nitrógeno, cuando los peces absorben este compuesto que contiene nitrógeno, el pescado los metaboliza y se excreta en forma de amonio (NH_4^+) como el principal desecho nitrogenado en el agua; Además, la ingesta de nitrógeno se excreta como desecho en 24 h (Hyacinth *et al.*, 2019). El ciclo del nitrógeno en la acuicultura comienza cuando se introduce la proteína del alimento para peces y luego es ingerida por los peces, luego se excreta a la fase acuosa en forma de nitrógeno de amoníaco total (NH_3) y amonio (NH_4^+). El amoníaco se oxida primero a nitrito (NO_2^-) por bacterias oxidantes de amoníaco (AOB), y luego se convierte a nitrato (NO_3^-) por bacterias oxidantes de nitrito (NOB), principalmente *Nitrobacter* spp. y *Nitrosospira* spp.) (Kim *et al.*, 2015). También se han detectado los AOB en la mayoría de los entornos aeróbicos como plantas de tratamiento de agua dulce, suelo y aguas residuales; las bacterias mencionadas anteriormente juegan un papel importante. Existen otras bacterias llamadas arqueas oxidantes de amoníaco (AOA) que se pueden encontrar en el agua de mar, los sedimentos estuarinos, el suelo y las plantas de tratamiento de aguas residuales (Cáceres *et al.*, 2018). A su vez el amoníaco se puede encontrar en dos formas en el medio acuático: amoníaco no ionizado (NH_3) y amoníaco ionizado (NH_4^+). Generalmente la salinidad afecta la tasa de ionización de amoníaco y la suma de ambas formas se expresan como nitrógeno amoniacal total (TAN), aunque el NH_3 se difunde rápidamente a través de las membranas branquiales, la membranas biológicas son generalmente menos permeables a las formas ionizadas, por otra lado la toxicidad del amoníaco aumenta con la temperatura del agua y el pH; una reducción de 10 unidades en la salinidad provoca el aumento del 10% en la fracción de NH_3 (Kır *et al.*, 2019). Hoy en día los alimentos que se pueden encontrar son los más comerciales, en las etiquetas se indican la cantidad de proteínas, fibra, ceniza etc., pero lo que realmente influye en demasía es la cantidad proteína y el tipo de proteína que contenga el alimento, por tal motivo una de las metodologías para poder evaluar el metabolismo es con la cantidad de excreciones que arrojan los peces debido al tipo de alimento y con dicha metodología corroborar que el alimento que se utiliza realmente los peces están aprovechando los nutrientes, que se le proveen por medio del alimento.

Referencias

- Abdel-Tawwab, M., Monier, M.N., Hoseinifar, S.H., Faggio, C., 2019. Fish response to hypoxia stress: growth, physiological, and immunological biomarkers. *Fish Physiol. Biochem.* <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00614-9>
- Belghit, I., Liland, N.S., Gjesdal, P., Biancarosa, I., Menchetti, E., Li, Y., Waagbø, R., Krogdahl, Å., Lock, E.J., 2019. Black soldier fly larvae meal can replace fish meal in diets of sea-water phase Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 503, 609–619. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.032>
- Biswas, A., Araki, H., Sakata, T., Nakamori, T., Takii, K., 2019. Optimum fish meal replacement by soy protein concentrate from soymilk and phytase supplementation in diet of red sea bream, *Pagrus major*, *Aquaculture*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.023>
- Boyd, C.E., 2013. 1 - Overview of aquaculture feeds: global impacts of ingredient use, *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100506-4.00001-5>
- Cáceres, R., Malińska, K., Marfà, O., 2018. Nitrification within composting: A review. *Waste Manag.* 72, 119–137. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.10.049>
- Cheng-Sheng, L., Lim, C., Gatlin III, D.M., Webster, C.D., 2015. *Dietary Nutrients, Additives and Fish Health*. John Wiley & Son, Inc.
- Christensen, E.A.F., Illing, B., Iversen, N.S., Johansen, J.L., Domenici, P., Ste, J.F., 2018. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology Effects of salinity on swimming performance and oxygen consumption rate of shiner perch *Cymatogaster aggregata* 504, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.04.002>
- Couto, A., Peres, H., Oliva-teles, A., Enes, P., 2016. Screening of nutrient digestibility , glycaemic response and gut morphology alterations in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed whole cereal meals. *Aquaculture* 450, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.006>
- Dantas, G., Karina, M., Cabral, D.V., Gardner, I.A., 2017. Characterization of tilapia farming in net cages at a tropical reservoir in Brazil. *Aquac. Reports* 6, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.03.002>
- Dayson, S., Culbreth, A., Hazel, D., Daniels, H., Guthrie, E., 2016. Science of the Total Environment Coupling aquaculture with forest plantations for food , energy , and water resiliency 571, 1262–1270. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.161>
- Dossou, S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Dawood, M.A.O., El Basuini, M.F., El-Hais, A.M., Olivier, A., 2018. Effect of partial replacement of fish meal by fermented rapeseed meal on growth, immune response and oxidative condition of red sea bream juvenile, *Pagrus major*. *Aquaculture* 490, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.010>
- Duodu, Collins P., Adjei-Boateng, D., Edziyie, R.E., Agbo, N.W., Owusu-Boateng, G., Larsen, B.K., Skov, P. V., 2018. Processing techniques of selected oilseed by-products of potential use in animal feed: Effects on proximate nutrient composition, amino acid profile and antinutrients. *Anim. Nutr.* 4, 442–451.

López-Tejeda, S., García-Trejo, J.F., Félix-Cuencas, L. y Villegas-Villegas, M. 2019. Variación del Metabolismo de los Peces Debido al Alimento en Sistemas Acuícolas (Revisión). En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), *Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 200-219.

- <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.05.007>
- Duodu, Collins P, Adjei-boateng, D., Edziyie, R.E., Agbo, N.W., Owusu-boateng, G., Larsen, B.K., Skov, P. V, 2018. Processing techniques of selected oilseed by-products of potential use in animal feed : Effects on proximate nutrient composition , amino acid profile and antinutrients. *Anim. Nutr.* 4, 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.05.007>
- Encarnação, P., 2016. aquaculture feeds. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800873-7.00005-1>
- Ern, R., Esbaugh, A.J., 2018. Comparative Biochemistry and Physiology , Part A Effects of salinity and hypoxia-induced hyperventilation on oxygen consumption and cost of osmoregulation in the estuarine red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 222, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.04.013>
- FAO, 2018. WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE.
- García-organista, A.A., Mata-sotres, J.A., Teresa, M., Rombenso, A.N., 2019. The effects of high dietary methionine and taurine are not equal in terms of growth and lipid metabolism of juvenile California Yellowtail (*Seriola dorsalis*). *Aquaculture* 512, 734304. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734304>
- Gerile, S., Pirhonen, J., 2017. Replacement of fishmeal with corn gluten meal in feeds for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) does not affect oxygen consumption during forced swimming. *Aquaculture* 479, 616–618. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.002>
- Giacomin, M., Dal, G., Eom, J., Schulte, P.M., Wood, C.M., 2019. Comparative Biochemistry and Physiology , Part A The effects of salinity and hypoxia exposure on oxygen consumption , ventilation , diffusive water exchange and ionoregulation in the Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 232, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.03.007>
- Glencross, B., 2016. application in aquaculture feeds, *Aquafeed Formulation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800873-7.00003-8>
- Gu, Z., Mu, H., Shen, H., Deng, K., Liu, D., Yang, M., Zhang, Y., Zhang, W., Mai, K., 2018. PT National Laboratory for Marine Science and Technology , Wen Hai Road , Qingdao. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.12.003>
- Huan, J., Cao, W., Qin, Y., 2018. Prediction of dissolved oxygen in aquaculture based on EEMD and LSSVM optimized by the Bayesian evidence framework. *Comput. Electron. Agric.* 150, 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.04.022>
- Hyacinth, J., Moniruzzaman, M., Park, Y., 2019. Evaluation of fish meal analogue as partial fish meal replacement in the diet of growing Japanese eel *Anguilla japonica*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 247, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.10.018>
- Ip, Y.K., Chew, S.F., 2018a. Acta Histochemica Air-breathing and excretory nitrogen metabolism in fishes. *Acta Histochem.* 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.08.013>
- Ip, Y.K., Chew, S.F., 2018b. Acta Histochemica Air-breathing and excretory nitrogen metabolism in fishes.

- Acta Histochem. 120, 680–690. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.08.013>
- Justino L.I.C, Katia R. Duarte R.K., Ana C. Freitas C.A., Teresa S.L. Panteleitchouk L.S.T., Duarte C.A., Rocha-Santos P.A.T. (2016). Contaminants in aquaculture: Overview of analytical techniques for their determination, Trends in Analytical Chemistry, 80, 293-310
- Kamalam, B.S., Mahija, J., Baral, P., Pandey, A., Akhtar, S., Ciji, A., Rajesh, M., 2019. Temperature and oxygen related ecophysiological traits of snow trout (*Schizothorax richardsonii*) are sensitive to seasonal changes in a Himalayan stream environment. J. Therm. Biol. 83, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.04.014>
- Kim, S., Brotto, A.C., Khanal, S.K., Hu, Z., Chandran, K., Lee, J.W., 2015. Effect of plant species on nitrogen recovery in aquaponics. Bioresour. Technol. 188, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.013>
- Kır, M., Sunar, M.C., Gök, M.G., 2019. Acute ammonia toxicity and the interactive effects of ammonia and salinity on the standard metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 511, 734273. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734273>
- Koch, J.F., Rawles, S.D., Webster, C.D., Cummins, V., Kobayashi, Y., Thompson, K.R., Gannam, A.L., Twibell, R.G., Hyde, N.M., 2016. Optimizing fish meal-free commercial diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture 452, 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.017>
- Kokou, F., Fountoulaki, E., 2018. Aquaculture waste production associated with antinutrient presence in common fish feed plant ingredients. Aquaculture 495, 295–310. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.003>
- Krogdahl, Å., Kortner, T.M., Jaramillo-torres, A., Ahmed, A., Gamil, A., Chikwati, E., Li, Y., Schmidt, M., Herman, E., Hymowitz, T., Teimouri, S., Storebakken, T., 2020. Removal of three proteinaceous antinutrients from soybean does not mitigate soybean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* , L). Aquaculture 514, 734495. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734495>
- Lekang, O., 2013. Aquaculture Engineering, Second Edi. ed. John Wiley & Son, Inc., Norway.
- Li, W.C.G.J.X., 2017. Effects of complete fish meal replacement by rice protein concentrate with or without lysine supplement on growth performance , muscle development and flesh quality of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) 1–11. <https://doi.org/10.1111/anu.12581>
- Ma, J., Qiao, L., Ji, L., Ren, B., Hu, Y., Zhao, R., Ren, Z., 2019. Chemosphere The online monitoring and assessment of thallium stress using oxygen consumption rate and carbon dioxide excretion rate of zebra fish (*Danio rerio*). Chemosphere 216, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.127>
- Ma, R., Liu, X., Meng, Y., Wu, J., Zhang, L., Han, B., 2019. Protein nutrition on sub-adult triploid rainbow trout (1): Dietary requirement and effect on anti-oxidative capacity , protein digestion and absorption. Aquaculture 507, 428–434. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.069>
- Magalhães, R., Sánchez-López, A., Leal, R.S., Martínez-Llorens, S., Oliva-Teles, A., Peres, H., 2017. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal as a fish meal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 476, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.021>

- Magnhagen, C., Backström, T., Nilsson, J., Brännäs, E., 2018. Oxygen consumption and swimming performance in Arctic charr with different pigmentation patterns. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 202, 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.01.006>
- Meng, X., Zhu, Z., Lu, R., 2019. Regulation of growth performance and lipid metabolism in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) with honeysuckle (*Lonicera japonica*) extract.
- Mohammadi, M., Mahboobi-soo, N., Farhadian, O., Malekpouri, P., 2019. Science of the Total Environment Metabolic and NH₄ excretion rate of fresh water species, *Chondrostoma regium* in response to environmental stressors, different scenarios for temperature and pH 648, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.131>
- Munekata, P.E.S., Zhu, Z., 2019. Challenges and opportunities regarding the use of alternative protein sources: Aquaculture and insects. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.03.003>
- Murray, L., Rennie, M.D., Svendsen, J.C., Enders, E.C., 2017. Respirometry increases cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: implications for measurements of 1–8. <https://doi.org/10.1111/jfb.13292>
- Nahrgang, J., Bender, M.L., Meier, S., Nechev, J., Berge, J., Frantzen, M., 2019. Ecotoxicology and Environmental Safety Growth and metabolism of adult polar cod (*Boreogadus saida*) in response to dietary crude oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 180, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.082>
- Ngugi, C.C., Oyoo-Okoth, E., Manyala, J.O., Fitzsimmons, K., Kimotho, A., 2017. Characterization of the nutritional quality of amaranth leaf protein concentrates and suitability of fish meal replacement in Nile tilapia feeds. *Aquac. Reports* 5, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.01.003>
- Okoye, C.N., Macdonald-jay, N., Kamunde, C., 2019. Effects of bioenergetics, temperature and cadmium on liver mitochondria reactive oxygen species production and consumption. *Aquat. Toxicol.* 214, 105264. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105264>
- Ren, Q., Zhang, L., Wei, Y., Li, D., 2018. Original papers A method for predicting dissolved oxygen in aquaculture water in an aquaponics system. *Comput. Electron. Agric.* 151, 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.06.013>
- Rodgers, G.G., Rummer, J.L., Johnson, L.K., McCormick, M.I., 2019. Impacts of increased ocean temperatures on a low-latitude coral reef fish – Processes related to oxygen uptake and delivery. *J. Therm. Biol.* 79, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.12.008>
- Rodgers, G.G., Tenzing, P., Clark, T.D., 2016. Experimental methods in aquatic respirometry: the importance of mixing devices and accounting 65–80. <https://doi.org/10.1111/jfb.12848>
- Rosewarne, P.J., Wilson, J.M., Svendsen, J.C., 2016. Measuring maximum and standard metabolic rates using intermittent-flow respirometry: a student laboratory investigation of aerobic metabolic scope and environmental hypoxia in aquatic breathers 265–283. <https://doi.org/10.1111/jfb.12795>
- Rummer, J.L., Binning, S.A., Roche, D.G., Johansen, J.L., 2016. Methods matter: Considering locomotory mode and respirometry technique when estimating metabolic rates of fishes. *Conserv. Physiol.* 4, 1–13. <https://doi.org/10.1093/conphys/cow008>

- Sedigh, M., Wagner, L., Kræmer, U., Katrine, B., Tolderlund, H., Harthøj, N., Hammershøj, M., 2018. Fishmeal with different levels of biogenic amines in aquafeed : Comparison of feed protein quality , fish growth performance , and metabolism. *Aquaculture* 488, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.030>
- Snyder, S., Nadler, L.E., Bayley, J.S., Svendsen, M.B.S., 2016. Effect of closed v . intermittent-flow respirometry on hypoxia tolerance in the shiner perch *Cymatogaster aggregata* 252–264. <https://doi.org/10.1111/jfb.12837>
- Svendsen, M.B.S., Bushnell, P.G., Steffensen, J.F., 2016. Design and setup of intermittent-flow respirometry system for aquatic organisms. *J. Fish Biol.* 88, 26–50. <https://doi.org/10.1111/jfb.12797>
- Ta, X., Wei, Y., 2018. Research on a dissolved oxygen prediction method for recirculating aquaculture systems based on a convolution neural network. *Comput. Electron. Agric.* 145, 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.12.037>
- Valenti, W.C., Kimpara, J.M., Preto, B. de L., Moraes-Valenti, P., 2018. Indicators of sustainability to assess aquaculture systems. *Ecol. Indic.* 88, 402–413. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.12.068>
- Wang, Y., Han, G., Pham, C. V., Koyanagi, K., Song, Y., Sudo, R., Lauwereyns, J., Cockrem, J.F., Furuse, M., 2019. An acute increase in water temperature can increase free amino acid concentrations in the blood , brain , liver , and muscle in goldfish (*Carassius auratus*).
- Yang, H., Csukás, B., Varga, M., Kucska, B., Szabó, T., Li, D., 2019. A quick condition adaptive soft sensor model with dual scale structure for dissolved oxygen simulation of recirculation aquaculture system. *Comput. Electron. Agric.* 162, 807–824. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.05.025>
- Ye, H., Xu, M., Chen, L., Tan, X., Chen, S., Zou, C., Sun, Z., Liu, Q., Ye, C., Wang, A., 2019. PT Key Laboratory of Subtropical Biodiversity and Biomonitoring ,. *aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.075>
- Zhou, C., Zhang, B., Lin, K., Xu, D., Chen, C., Yang, X., Sun, C., 2017. Near-infrared imaging to quantify the feeding behavior of fish in aquaculture. *Comput. Electron. Agric.* 135, 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.02.013>

Ácido Araquidónico en Organismos de Acuicultura Silvestres y Cultivados y su Relación con el Estrés

Elena Palacios Mechetnov

Laboratorio de Metabolismo de Lípidos

Programa de Acuicultura

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

La Paz, BCS, México.

epalacio@cibnor.mx

Resumen

Los niveles de ácidos araquidónico (ARA, 20:4n-6) son por lo general, menores en organismos acuáticos de cultivo en comparación con los silvestres. En contraste, los niveles de ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) por lo general, son mayores en organismos cultivados en comparación con silvestres. Los organismos silvestres se consideran de mejor calidad, por lo que una alternativa es incrementar los niveles de ARA en la dieta para organismos de cultivo, hasta alcanzar los niveles que tienen los silvestres. Los niveles de inclusión de DHA y ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) en el alimento pueden incrementarse sin un efecto perjudicial en la mayor parte de los organismos (con la limitante del costo de producción), los experimentos para incrementar ARA han tenido resultados contradictorios. El ARA es el principal sustrato para la producción de eicosanoides que tienen un efecto inflamatorio. La síntesis de eicosanoides a partir de ARA puede ser modulada por EPA y DHA, por lo que la relación de omega 6, como el ARA y omega 3, como el EPA y DHA, es muy importante. En la presente revisión se discuten algunos de los parámetros que afectan los niveles de estos ácidos grasos en tejidos y su efecto fisiológico en los organismos.

Palabras clave: ácidos grasos; camarón; estrés; lípidos; moluscos; peces; respuesta inmune;

Ácidos grasos en organismos silvestres y cultivados.

En acuicultura es común que se analice la composición de organismos silvestres para tratar de igualar dicha composición en el alimento que se va a ofrecer a los organismos de cultivo: se considera que la composición bioquímica de un organismo silvestre es la mejor y la más adecuada, dado que el desempeño en crecimiento, reproducción y producción son por lo general mayores para organismos silvestres. Cuidar la composición bioquímica es particularmente importante para los compuestos químicos que no son sintetizados por los organismos, como lo son los ácidos grasos (AG) altamente polinsaturados (HUFA, por sus siglas en inglés), algunos aminoácidos, vitaminas, etc. La mayor parte de los estudios en acuicultura se han enfocado a los HUFA que pertenecen a la familia de omega 3, tales como el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) y el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), dado que son los HUFA mayoritarios (pueden componer el 40% del total de AG) y son AG esenciales (EFA, por sus siglas en inglés). El DHA es particularmente importante para los organismos en crecimiento dado que se usa en la formación del sistema nervioso y cuando el alimento es deficiente en DHA ocurren malformaciones de las larvas. El EPA está asociado a una mejor supervivencia durante el desarrollo lecitotrófico y es antiinflamatorio después de una respuesta inmune (Tocher, 2010). El ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6), un HUFA de la familia de los omega 6 que es precursor de eicosanoides, está menos estudiado, dado que sus niveles son bajos (0.5-4%), por lo que algunas publicaciones mas antiguas ni siquiera lo reportan. En la Tabla 1 se muestra la comparación de los principales tres HUFA en músculo de peces marinos silvestres y cultivados. Los niveles de EPA y DHA son variables; en algunos trabajos se reporta como mayor en peces cultivados y menor en otros. En contraste, los niveles de ARA en casi todos, con excepción de uno de los trabajos, son más bajos en organismos cultivados, en ocasiones, una disminución a un tercio del valor en silvestres.

Tabla 1. Comparación de HUFA (% de ácidos grasos totales) en músculo de peces marinos de origen silvestre o de cultivo.

Organismo	HUFA	Silvestres	Cultivados	P	Referencia
Rodaballo	ARA	4.3+0.4	1.8+0.1 *	B	Busetto <i>et al.</i> , 2008
Adulto-músculo	EPA	9.7+0.3	11.1+0.2 *	S	
Halibut	ARA	2.9+0.3	0.5+0.04 *	B	Olsson <i>et al.</i> , 2003
Adulto-músculo	EPA	12.2+1.1	5.7+0.1 *	B	
Robalo (sea bass)	ARA	0.6+0.0	0.7+0.1	S	Yildiz <i>et al.</i> , 2008
Adulto-músculo	EPA	5.2+0.1	6.0+0.2 *		
Robalo (sea bass)	ARA	7.4+0.5	1.1+0.1 *	B	Alasalvar <i>et al.</i> , 2002
Adulto-músculo	EPA	10.6+0.4	6.0+0.2 *	B	
Robalo (sea bass)	ARA	5.1+0.7	0.6+0.04 *	B	Orban <i>et al.</i> , 2003
Adulto-músculo	EPA	7.1+0.7	7.7+0.4		
Robalo (sea bass)	ARA	1.6+0.2	0.6+0.05 *	B	Bell <i>et al.</i> , 2007
Adulto-músculo	EPA	8.6+0.2	8.1+0.1		
Dorada (sea bream)	ARA	1.2+0.0	0.7+0.0 *	B	Yildiz <i>et al.</i> , 2008
Adulto-músculo	EPA	2.0+0.0	4.5+0.3 *	S	
Dorada (sea bream)	ARA	5.9+0.2	0.6+0.2 *	B	Grigorakis <i>et al.</i> , 2002
Adulto-músculo	EPA	7.0+0.9	5.7+0.9		
Dorada (sea bream)	ARA	2.5+0.2	0.8+0.2 *	B	Orban <i>et al.</i> , 2003
Adulto-músculo	EPA	5.0+0.4	7.5+0.6 *	S	
Dorada (sea bream)	ARA	11.8+0.8	1.6+0.1 *	B	Mnari <i>et al.</i> , 2007
Adulto-músculo	EPA	7.6+0.3	7.7+0.2		
Dorada (sea bream)	ARA	4.3+0.3	0.8+0.0 *	B	Morrison <i>et al.</i> , 2007
Adulto-músculo	EPA	6.5+0.3	9.4+0.2 *	S	
Chopa	ARA	4.8+0.5	0.8+0.1 *	B	Rodríguez <i>et al.</i> , 2004
Adulto-músculo	EPA	6.2+0.2	7.3+0.1 *	S	
Sargo (sea bream)	ARA	5.0+0.9	1.7+0.2 *	B	Cejas <i>et al.</i> , 2003
Adulto-músculo	EPA	3.9+0.3	6.0+0.4 *	S	
Sargo (sea bream)	ARA	3.2+0.7	1.0+0.1 *	B	Rueda <i>et al.</i> , 2001
Adulto-músculo	EPA	6.7+0.4	10.1+0.4 *	S	
Pez limón (amberjack)	ARA	2.1+0.1	0.9+0.1 *	B	Rodríguez-Barreto <i>et al.</i> , 2012
Adulto-músculo	EPA	1.9+0.1	11.4+0.3 *	S	
Pargo	ARA	9.3+0.4	1.0+0.1 *	B	Rueda <i>et al.</i> , 1997
Adulto-músculo	EPA	7.1+0.3	7.5+0.2		

Los datos se reportan como medias + error estándar. Los asteriscos indican diferencia significativa ($P < 0.05$). Algunos datos fueron transformados a partir de la referencia original para facilitar la comparación.

Algo similar ocurre con los peces dulceacuícolas e incluso, en crustáceos silvestres y de cultivo, donde los niveles de ARA fueron menores en casi todos los casos, con excepción de un reporte en salmón (Tabla 2). Los organismos de cultivo son alimentados con altos niveles de HUFA n-3, por lo que es frecuente que los niveles de DHA y EPA sean más altos que en organismos silvestres. El alimento para organismos de cultivo incluye altos niveles de aceite de pescado como sardina y macarela, que aportan un alto porcentaje de HUFA n-3. Esta alta proporción de HUFA n-3 se debe a que las formulaciones de alimentos están fuertemente influenciadas por las necesidades de especies de peces marinos de aguas frías, como las que se cultivan en el norte de Europa, donde se iniciaron los estudios de alimento formulado para peces: Sin embargo, especies de climas tropicales o dulceacuícolas no necesariamente tienen las mismas necesidades de HUFA. Los peces y crustáceos marinos no son capaces de sintetizar HUFA, mientras que los peces dulceacuícolas y diádromos por lo general sí pueden.

Síntesis de HUFA

Todos los animales sintetizan el ácido palmítico (16:0) y a partir de ahí, pueden elongar (añadir carbonos) y desaturar (introducir dobles enlaces) para producir ácidos grasos omega 9, tales como los AG monoinsaturados (MUFA, por sus siglas en inglés) como el 18:1n-9 o el 20:1n-9. A partir de estos precursores, las plantas pueden sintetizar ácidos grasos polinsaturados (PUFA) de 18 carbonos, tales como el 18:2n-6 o el 18:3n-3 dado que expresan la delta 12 desaturasa ($\Delta 12D$). Muchos animales no expresan esta desaturasa, así que requieren 18:2n-6 o el 18:3n-3 en el alimento para sintetizar ARA, EPA y DHA, pero los organismos dulceacuícolas sí pueden elongar y desaturar PUFA para producir HUFA.

Tabla 2. Comparación de HUFA (% de ácidos grasos totales) en músculo de peces dulceacuícolas (PD), anádromos y catádromos (AC) y crustáceos (C) de origen silvestre o de cultivo.

	Organismo	HUFA	% silvestres	% cultivados		Referencia
AC	Salmón del Atlántico	ARA	8.3+0.04	0.5+0.01		Ackman y
	juvenil-músculo	EPA	4.6+0.01	2.1+0.01		Takeuchi, 1986
	Salmón del Atlántico	ARA	0.4+0.03	0.9+0.1 *	S	Blanchet <i>et al.</i> ,
	Adulto-músculo	EPA	6.6+0.4	7.9+0.6 *	S	2005
PD	Anguila japonesa	ARA	1.8+0.1	0.3+0.1 *	B	Suzuki <i>et al.</i> ,
	Adulto-músculo	EPA	2.9+0.2	2.3+0.1	S	1986
	Carpa	ARA	7.5+1.2	0.9+0.4 *	B	Suzuki <i>et al.</i>
	Adulto-músculo	EPA	7.0+1.6	2.5+0.5 *	B	,1986
	Trucha	ARA	1.7+0.2	1.5+0.1		Suzuki <i>et al.</i> 1986
	Adulto-músculo	EPA	5.3+0.6	5.2+0.05		
	Tilapia del Nilo	ARA	4.6+0.6	0.9+0.2 *	B	Karapanagiotidis
	Adulto-músculo	EPA	1.1+0.1	0.8+0.04		<i>et al.</i> , 2006
	Trucha	ARA	5.4+1.0	0.9+0.1 *	B	Blanchet <i>et al.</i> ,
	Adulto-músculo	EPA	8.1+0.4	7.3+0.7		2005
	Lucio europeo	ARA	8.6+0.2	0.7+0.02 *	B	Jankowska <i>et al.</i> ,
	Adulto-músculo	EPA	6.7+0.2	9.4+0.5 *	S	2008
	Dojo	ARA	5.1+0.1	0.8+0.0 *	B	Gao <i>et al.</i> , 2012
	Adulto-completo	EPA	3.8+0.1	5.4+0.0 *	S	
	Perca	ARA	7.3+0.4	0.8+0.2 *	B	Jankowska <i>et al.</i> ,
	Adulto-músculo	EPA	7.3+0.3	7.2+0.2		2010
	Perca	ARA	6.6+0.1	1.9+0.2 *	B	Mairesse <i>et al.</i> ,
	Adulto-músculo	EPA	12.5+0.1	10.9+0.3 *	B	2006
C	Matrinchán	ARA	1.3+0.3	2.1+0.2		Almeida y
	Adulto- músculo	EPA	0.2+0.04	0.1+0.02 *	B	Franco, 2007
	Camarón tigre	ARA	8.8+0.1	9.6+1.0		Meunpol <i>et al.</i> ,
	Adulto-músculo	EPA	11.0+0.1	6.2+1.2		2005 (b)
	Camarón blanco del Pacífico	ARA	5.1+0.1	4.2+0.1		Browdy <i>et al.</i> ,
	Adulto-completo	EPA	17.2+0.7	16.1+0.3		2006 (b)
	Camarón blanco de la India	ARA	4.7+0.5	0.6+0.2 *	B	Ouraji <i>et al.</i> , 2011
	Adulto-músculo	EPA	12.4+1.0	7.7+1.5 *	B	(a)
	Cangrejo de Shanghái	ARA	7.8+0.3	5.1+0.5 *	B	Wu <i>et al.</i> , 2007
	Adulto-músculo	EPA	10.7+0.1	9.4+0.5 *	B	

Los datos se reportan como medias + error estándar, excepto donde se indica (a). Los asteriscos indican diferencia significativa ($P < 0.05$), excepto donde no se reportó (b). Algunos datos fueron transformados a partir de la referencia original para facilitar la comparación.

Así, en organismos como la tilapia los EFA que tienen que estar presentes en la dieta son los PUFA 18:3n-3 y 18:2n-6. Esto se debe a que la dieta de la tilapia es naturalmente pobre en HUFA. En peces y crustáceos marinos, los EFA son los HUFA, como el EPA, DHA y ARA, dado que la dieta es rica en HUFA y por lo general no requiere sintetizarlos (Tocher, 2010). Cuando los organismos marinos se cultivan, requieren un aporte importante de HUFA en la dieta en forma de harina y aceite de pescado o sustitutos ricos en HUFA como aquellos derivados de algas.

Las plantas pueden sintetizar 18:3n-3 a partir de un omega 6 como es el 18:2n-6 dado que poseen la $\Delta 15D$. En cambio, los animales solo pueden sintetizar HUFA omega 3 a partir de PUFA omega 3, o HUFA omega 6 a partir de PUFA omega 6. Algunas excepciones son el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, que puede sintetizar AG omega 3 a partir de omega 6 y que además expresan la $\Delta 12D$ (Wallis et al., 2002). El hongo *Mortierella alpina* también puede sintetizar AG omega 3 a partir de omega 6. Otros organismos, como las bacterias, sintetizan ácidos grasos ramificados en vez de insaturados. Por lo general, los peces herbívoros tienen mayor capacidad de sintetizar HUFA a partir de PUFA, mientras que los carnívoros pierden la capacidad de sintetizar HUFA dado que la mayor parte de las presas son naturalmente ricas en HUFA, que utilizan para su propio sistema nervioso y acumulan en huevos durante la reproducción. La *Artemia* es rica en EPA, pero no contienen DHA y cuando son enriquecidas con emulsiones derivadas de peces o algas marinas ricas en DHA, lo convierten en EPA, por lo que los tiempos de enriquecimiento de *Artemia* son esenciales para mantener los niveles de DHA altos para su consumo por larvas de peces. Los rotíferos prácticamente no contienen HUFA, pero como la *Artemia* se pueden enriquecer. Los copépodos en contraste, contienen altas proporciones de EPA ($\cong 8\%$) y DHA ($\cong 15\%$) aún sin enriquecer, pero los copépodos acumulan los HUFA en ésteres de cera, que son los lípidos de reserva mayoritarios ($\cong 70\%$) en algunas especies de copépodos en comparación de los triglicéridos (TG) y fosfolípidos (FL) en la mayoría de los animales (Sargent et al., 1977; Coutteau y Mourente, 1997; Bell et al., 2003). Los ésteres de cera son fácilmente digeribles por peces y aves marinas (90%) en comparación con mamíferos (50%) (Place, 1992) pero es posible

que el transporte y la acumulación de HUFA n-3 después de ser digeridos a partir de ésteres de cera no sea similar a cuando estos AG provienen de TG o FL.

Factores ambientales

Además de diferencias de origen marino o dulceacuícola, hay otros factores que pueden influir en los niveles de HUFA de los organismos. Por ejemplo, los peces dulceacuícolas de climas templados/tropicales como la tilapia, tienen menos HUFA n-3 en músculo que los peces dulceacuícolas de climas más fríos, como la trucha. Los niveles de ARA son por lo general, mayores en peces dulceacuícolas en comparación con marinos, mientras que los niveles de HUFA n-3 en peces dulceacuícolas son por lo general, bajos (Ackman et al., 2002). La temperatura del agua influye en los AG, dado que a mayor número de insaturaciones que tiene un AG, mayor es la rotación que tiene cuando está unido a un FL, lo cual incrementa la fluidez de la membrana celular. La membrana celular debe de estar en un estado tipo gel para que la célula sea viable, por lo que, en climas fríos, los organismos incrementan los ácidos grasos con insaturaciones (HUFA) presentes en los FL de la membrana celular, mientras que en climas cálidos los disminuyen.

Algo similar sucede con la salinidad del agua, donde a mayor salinidad, mayor el número de insaturaciones en los AG unidos a los FL de membrana, en particular en organismos estenohalinos, que tienen una osmolaridad similar a la del agua en la que habitan. Los HUFA afectan la actividad de enzimas incrustadas en la membrana celular y, en particular, las enzimas Na^+/K^+ -ATPasa, que son las principales reguladoras de los iones entre el interior y exterior de las células. Los peces son eurihalinos, manteniendo una osmolaridad de la sangre independientemente de los cambios del agua por lo que la regulación de iones es muy activa. Así, se espera que peces marinos de climas fríos tengan niveles mayores de HUFA, con niveles intermedios para peces dulceacuícolas de climas fríos y de peces marinos de climas más cálidos, con niveles más bajos en peces dulceacuícolas de climas cálidos. Tal es el caso del matrinchán, un pez dulceacuícola tropical de Sudamérica que tiene una muy baja proporción de EPA y DHA. Curiosamente, los niveles de ARA aumentaron en organismos de cultivo en esta especie (Almeida y Franco, 2007).

Otros casos interesantes son los peces anádromos como el salmón o catádmomos como la anguila. El salmón tiene la capacidad de sintetizar HUFA usando PUFA como sustrato, pero solo cuando

es adulto: En etapas larvarias se requieren alimentos ricos en HUFA. En estos peces, el alimento para crecimiento y engorda puede contener grandes cantidades de harina de plantas terrestres en lugar de harina de pescado, sin afectar su supervivencia o crecimiento. Sin embargo, en organismos de cultivo, alimentados con harina de plantas, el musculo de salmón tiene mucho menos HUFA que en organismos silvestres, por lo que su calidad nutricia para humano es menor. Una alternativa a lo anterior es darles un alimento terminal a los salmones determinado tiempo antes de su cosecha. Este alimento es rico en HUFA y carotenoides, lo cual promueve la acumulación de estos ácidos grasos y pigmentos en el organismo, logrando que los niveles sean similares a los salmones silvestres. Estas dietas terminales, llamadas finishing diets en inglés, ya se han probado en distintas especies de peces marinos y dulceacuícolas (Bell et al., 2003; Glencross et al., 2003; Mourente y Bell, 2006; Fountoulaki et al., 2009).

Acumulación de HUFA en distintos tejidos

Dado que los peces dulceacuícolas, en particular si son herbívoros, no requieren HUFA mientras que los peces marinos sí, estos últimos acumulan los HUFA de la dieta en los tejidos, en particular en la grasa, hígado o hepatopáncreas para ser movilizados cuando se requiere, en particular durante la reproducción. Como los peces dulceacuícolas sintetizan HUFA cuando los requieren, se considera que acumulan muy pocos HUFA en músculo, porque prefieren acumular AG saturados. Los AG saturados proporcionan más energía que los PUFA o HUFA, dado que los AG saturados están más reducidos al no tener dobles enlaces, por lo que un ácido graso de 20 carbonos saturado (20:0) produce 12 ATP más que un HUFA como el EPA, que tiene 5 dobles enlaces. Además, la maquinaria enzimática para introducir dobles enlaces no es compleja y muchos animales no la tienen o la presentan parcialmente, por lo que los HUFA se conservan para funciones específicas mientras que los AG saturados se usan para energía. En ocasiones, cuando el alimento para animales es pobre en PUFA/HUFA, se incorpora 20:1n-9 a los fosfolípidos (FL) de la membrana celular (MC), por lo que este ácido graso puede ser un indicador en algunos organismos de niveles inadecuados de EFA. Dado que el ARA es precursor de hormonas, llamadas eicosanoides y que incluyen prostaglandinas (PG) y leucotrienos, los cuales son necesarios para la reproducción y tienen un papel importante en la respuesta inmune, es posible que el ARA sea preferencialmente

acumulado en otros tejidos distintos al músculo, donde se requieren eicosanoides, tales como ovarios, espermátóforos, huevos, etc. (Tabla 3). Como se observa, la disminución en la proporción de ARA en organismos de cultivo en comparación con silvestres es evidente en varios de los tejidos analizados.

Tabla 3. Comparación de HUFA (% de ácidos grasos totales) en distintos tejidos de peces marinos (PM), dulceacuícolas (PD), catádromos/anádromos (CA) y crustáceos (C) de origen silvestre o de cultivo.

	Organismo	HUFA	Silvestres	Cultivados	P	Referencia
PM	Lenguado	ARA	3.0+0.1	1.0+0.0 *	B	Lund <i>et al.</i> , 2008 (a)
	Huevos	EPA	15.5+0.0	15.2+0.6		
	<i>Solea solea</i>	DHA	27.6+1.0	29.6+1.5		
	Dorada (sea bream)	ARA	7.1+1.1	1.5+0.1 *	B	Mnari <i>et al.</i> , 2007
	Adulto-hígado	EPA	4.5+0.1	7.6+0.2 *	S	
	<i>Sparus aurata</i>	DHA	5.1+0.8	23.7+0.5 *	S	
	Sargo (sea bream)	ARA	3.4+0.4	1.3+0.04 *	B	Cejas <i>et al.</i> , 2003
	Adulto-ovarios	EPA	4.9+0.6	6.7+0.2 *	S	
	<i>Diplodus sargus</i>	DHA	23.1+3.0	27.5+0.8		
	Sargo (sea bream)	ARA	4.9+0.6	0.8+0.1 *	B	Rueda <i>et al.</i> , 2001
	Adulto-hígado	EPA	6.3+0.2	5.0+0.4 *	B	
	<i>Diplodus puntazo</i>	DHA	19.1+1.2	7.4+1.4 *	B	
	Sargo (sea bream)	ARA	1.3+0.2	0.7+0.02 *	B	Rueda <i>et al.</i> , 2001
	Adulto-grasa	EPA	4.3+0.2	8.4+0.3 *	S	
	<i>Diplodus puntazo</i>	DHA	6.5+0.8	8.8+0.3 *	S	
	Pez limón (amberjack)	ARA	4.1+0.1	2.5+0.1 *	B	Rodríguez-Barreto <i>et al.</i> , 2012
	Adulto-ovarios	EPA	3.0+0.3	9.3+0.2 *	S	
	<i>Seriola dumerili</i>	DHA	23.3+1.4	24.6+0.4		
	Pez limón (amberjack)	ARA	3.7+0.2	0.8+0.1 *	B	Rodríguez-Barreto <i>et al.</i> , 2012
	Adulto-hígado	EPA	2.2+0.2	7.7+0.6 *	S	
	<i>Seriola dumerili</i>	DHA	15.9+1.0	8.0+0.2 *	B	
	Bacalao	ARA	3.0+0.1	1.0+0.0 *	B	Salze <i>et al.</i> , 2005
	Huevos	EPA	15.5+0.0	15.2+0.6		
	<i>Gadus morhua</i>	DHA	27.6+1.0	29.6+1.5		
	Perca	ARA	7.11+0.2	0.3+0.1 *	B	Jankowska <i>et al.</i> , 2010
	Adulto-hígado	EPA	4.0+0.2	3.5+0.6		
	<i>Perca fluviatilis</i>	DHA	21.3+0.4	16.4+1.4 *	B	

	Perca	ARA	8.4+0.2	0.5+0.1 *	B	Jankowska <i>et al.</i> , 2010
	Adulto-grasa	EPA	7.5+0.3	6.1+0.1 *	B	
	<i>Perca fluviatilis</i>	DHA	10.6+0.1	8.5+0.4 *	B	
	Caballito de mar	ARA	9.2+0.1	4.5+0.1 *	B	Vite <i>et al.</i> , 2014
	Recién nacidos	EPA	7.4+0.4	3.6+0.2		
	<i>Hippocampus erectus</i>	DHA	21.5+0.6	20.1+0.6		
AC	Anguila japonesa	ARA	3.4+0.4	0.6+0.04 *	B	Ozaki <i>et al.</i> , 2008
	Huevos	EPA	3.1+0.6	4.5+0.2 *	S	
	<i>Anguilla japonica</i>	DHA	6.7+0.7	11.0+0.7 *	S	
PD	Pez blanco de Pátzcuaro	ARA	8.3+1.2	2.2+0.1 *	B	Palacios <i>et al.</i> , 2007
	Adulto	EPA	4.0+0.1	3.6+0.1		
	<i>Chirostoma estor</i>	DHA	21.8+1.4	33.9+0.5		
C	Cangrejo azul	ARA	4.9+1.1	2.6+0.1 *	B	Wu <i>et al.</i> , 2010
	Huevos	EPA	8.7+0.5	7.7+0.3 *	B	
	<i>Portunus trituberculatus</i>	DHA	12.1+2.1	15.3+0.7 *	S	
	Cangrejo de Shanghái	ARA	2.4+0.2	1.1+0.5		Wu <i>et al.</i> , 2007
	Adulto-hepatopáncreas	EPA	3.6+0.2	2.4+0.6		
	<i>Eriocheir sinensis</i>	DHA	6.7+2.1	1.5+0.1 *	B	
	Cangrejo de Shanghái	ARA	5.1+0.4	5.5+0.8		Wu <i>et al.</i> , 2007
	Adulto-gónada	EPA	6.5+0.6	4.6+0.3 *	B	
	<i>Eriocheir sinensis</i>	DHA	6.7+2.1	4.3+4.2		
	Camarón tigre	ARA	9.6+0.8	9.2+0.8		Meunpol <i>et al.</i> , 2005 (b)
	Adulto-hepatopáncreas	EPA	3.4+0.8	10.0+0.3		
	<i>Penaeus monodon</i>	DHA	4.0+0.4	5.2+0.4		
	Camarón tigre	ARA	16.2+0.2	12.4+0.5		Meunpol <i>et al.</i> , 2005 (b)
	Adulto-espermatóforo	EPA	6.2+0.2	10.7+0.5		
	<i>Penaeus monodon</i>	DHA	10.5+0.2	14.3+0.5		

Los datos se reportan como medias + error estándar, excepto donde se indica (a). Los asteriscos indican diferencia significativa ($P<0.05$), excepto donde no se reportó (b). Algunos datos fueron transformados a partir de la referencia original para facilitar la comparación.

Curiosamente, los niveles de HUFA n-3 en huevos fueron muy similares entre organismos de cultivo y silvestres, lo cual podría indicar que la regulación de estos niveles es muy estrecha en esta etapa de vida. Aún si los adultos tienen la capacidad para la síntesis de HUFA, las larvas de la mayor parte de los organismos usados en acuicultura no sintetizan HUFA; esto incluye a las

larvas de peces dulceacuícolas, que de adultos sí presentan esta capacidad. Algunas especies, como los ostiones, que no requieren DHA en etapa adulta, sí lo usan en estadios larvarios para construcción de sistema nervioso. Por ende, durante la reproducción de peces, moluscos y crustáceos altas proporciones de HUFA son transferidos a la gónada en forma de lipoproteína (unida a FL, proteínas y pigmentos), dado que los AG son hidrofóbicos y no pueden circular en forma libre en la sangre/hemolinfa. Las lipoproteínas producidas en hígado/hepatopáncreas durante la maduración se denominan por lo general vitelogenina y son almacenadas en los ovocitos como vitelinas, compuesta por FL que, a su vez, son ricos en HUFA. En contraste, los AG saturados y MUFA son preferencialmente almacenados como triglicéridos (TG) en las gotas lipídicas de los ovocitos. Durante el desarrollo lecitotrófico se usan principalmente los TG como fuente de energía, mientras que los compuestos del vitelo se usan para construcción de tejido. Al final del desarrollo lecitotrófico, incluso el EPA es usado como fuente de energía, mientras que el DHA es usado en la formación de sistema nervioso y ocular en larvas (Tocher, 2010). En especies con períodos de incubación prolongada (60-80 días) tales como las truchas, el contenido de TG es alto (60% del total de lípidos), mientras que en especies con períodos de incubación cortos (9-15 días) es mayor el contenido de PL (60-80%).

El uso de TG y FL también se ve afectado por la temperatura, dado que el metabolismo es mayor en especies tropicales comparado con las especies templadas. Por último, en especies carnívoras los requerimientos de DHA son mayores, dado que se requieren para la formación del sistema ocular, necesario para captura de presas antes de la reabsorción del saco vitelino. Las deficiencias de HUFA n-3 y n-6 durante la reproducción de peces se manifiestan como una inhibición de la síntesis y secreción de gonadotropinas y esteroides, incremento de atresias, una baja fecundidad y volumen de esperma, bajas tasas de fertilización y eclosión, así como elevadas tasas de mortalidad larvaria, entre otros (Navas *et al.*, 1997). Curiosamente, en el espermatóforo de camarón se encontraron los mayores niveles de ARA hasta ahora reportados, lo cual concuerda con la síntesis de PG a partir de ARA: las PG fueron por primera vez descritas en próstata. En machos se ha observado que el contenido de HUFA en la dieta influye sobre la concentración, volumen y motilidad del esperma, afectando la fertilización y la eclosión.

Acumulación de HUFA en grasa

Una consideración a la comparación anterior, es que los organismos tienen distinta cantidad de grasa. Los de clima frío acumulan más TG que los de climas cálidos. Por lo general, los organismos de cultivo tienen una cantidad de grasa mayor en comparación con los organismos silvestres. Por ejemplo, 3.4 mg g⁻¹ en músculo de *S. dumerili* en comparación con 12.9 mg g⁻¹ en cultivados (Rodríguez-Barreto *et al.*, 2012). En músculo de halibut (*H. hippoglossus*) sube de 0.15 a 3.5% (Olsson *et al.*, 2003). En músculo de robalo (*D. labrax*) sube de 4.8 a 11.0% (Bell *et al.*, 2007). En dorada (*S. aurata*) incremento de 0.09 a 0.15% en músculo y de 0.5 a 0.7% en hígado (Mnari *et al.*, 2007). En músculo de sargo (*D. punctazzo*) sube de 38.7 a 75.9 g kg⁻¹ (Rueda *et al.*, 2001). En lucio (*E. lucius*) incrementó de 0.2 a 2.4% en músculo (Jankowska *et al.*, 2008). En tilapia (*O. niloticus*), sube de 6.7 mg g⁻¹ en músculo a 18.0 mg g⁻¹ en cultivados (Karapanagiotidis *et al.*, 2006). En músculo de cangrejo es similar tanto en *S. serrata* (42.5-46.4 mg g⁻¹ ms), como en *E. sinensis* 2.0-2.3 (Alava *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007), pero sube en ovarios de cangrejos cultivados de 82.7 a 118.2 mg g⁻¹ ms (Alava *et al.*, 2007) y hepatopáncreas de 19.1 a 33.4% (Wu *et al.*, 2007). Esto puede deberse a que los organismos de cultivo están confinados, pero también a que el alimento para organismos de cultivo es en general, rico en aceites. Si los niveles de lípidos totales son mayores en organismos cultivados, la concentración de ARA podría ser similar entre organismos de cultivo y silvestres y probablemente los niveles de EPA y DHA serían superiores en organismos de cultivo. Sin embargo, son pocos los trabajos que reportan concentración de HUFA. En la Tabla 4, se muestran algunos trabajos donde se compara las concentraciones de HUFA entre organismos silvestres y cultivados.

Tabla 4. Comparación de HUFA (g 100g⁻¹ ms) en organismos de origen silvestre o de cultivo.

	Organismo	HUFA	Concentración silvestres	Concentración cultivados		Referencia
PM	Lenguado	ARA	0.3	0.1		Lund <i>et al.</i> , 2007 (a,b)
	Huevos	EPA	0.4	0.4		
	<i>Solea solea</i>	DHA	2.9	3.8		
	Sargo (sea bream)	ARA	0.8+0.2	0.3+0.0 *	B	Rueda <i>et al.</i> , 2001
	Adulto-músculo	EPA	1.7+0.1	2.5+0.1 *	S	
	<i>Diplodus puntazo</i>	DHA	2.3+0.3	2.7+0.2		
	Sargo (sea bream)	ARA	1.2+0.2	0.2+0.03 *	B	Rueda <i>et al.</i> , 2001
	Adulto-hígado	EPA	1.6+0.04	1.2+0.1 *	B	
	<i>Diplodus puntazo</i>	DHA	4.8+0.3	1.8+0.4 *	B	
	Sargo (sea bream)	ARA	0.3+0.0	0.2+0.0 *	B	Rueda <i>et al.</i> , 2001
	Adulto-grasa	EPA	1.1+0.1	2.1+0.1 *	S	
	<i>Diplodus puntazo</i>	DHA	1.6+0.2	2.2+0.1 *	S	
PD	Tilapia del Nilo	ARA	0.09+0.02	0.05+0.01		Karapanagiotidis <i>et al.</i> 2006
	Macho adulto-músculo	EPA	0.02+0.0	0.04+0.01		
	<i>Oreochromis niloticus</i>	DHA	0.2+0.01	0.41+0.05		
C	Cangrejo de mangle	ARA	0.7	0.5 *	B	Alava <i>et al.</i> , 2007 (a)
	Adulto-músculo	EPA	0.8	0.7		
	<i>Scylla serrata</i>	DHA	0.5	3.8		
	Cangrejo de mangle	ARA	3.4	1.4 *	B	Alava <i>et al.</i> , 2007 (a)
	Adulto-hepatopáncreas	EPA	2.5	1.3 *	B	
	<i>Scylla serrata</i>	DHA	2.1	1.1 *	B	
	Cangrejo de mangle	ARA	1.6	1.8 *	S	Alava <i>et al.</i> , 2007 (a)
	Adulto-ovarios	EPA	1.5	2.0 *	S	
	<i>Scylla serrata</i>	DHA	1.5	1.9 *	S	
	Cangrejo de mangle	ARA	1.9	1.7 *	B	Alava <i>et al.</i> , 2007 (a)
	Huevos	EPA	1.9	2.1 *	S	
	<i>Scylla serrata</i>	DHA	1.6	3.8 *	S	

Los datos se reportan como medias + error estándar, excepto donde se indica (a). Los asteriscos indican diferencia significativa ($P<0.05$), excepto donde no se reportó (b). Algunos datos fueron transformados a partir de la referencia original para facilitar la comparación y se reportan en peso o masa seca (ms).

Los valores de DHA y EPA son incluso mayores en organismos de cultivo en comparación con silvestres, dado que hay más lípidos, la concentración de ARA sigue siendo menor. Lo anterior

podría indicar, para empezar, que mientras que el alimento para organismos de cultivo está formulado adecuadamente o incluso, sobradamente para DHA y EPA para organismos de cultivo, no es suficiente para que los niveles de ARA se asemejen a los organismos silvestres. Es necesario precisar que niveles muy altos de EPA y DHA implican un gasto mayor en la producción de alimento y no necesariamente indican una mejor calidad o desempeño durante el cultivo (crecimiento, supervivencia, tolerancia a estrés, parámetros reproductivos, etc.). Algunos organismos, como los camarones, no requieren una alta concentración de DHA y acumulan un tercio de lo que acumulan peces marinos. En el caso de moluscos y, en particular, ostiones, tienen cantidades despreciables de DHA. Sin embargo, durante la época reproductiva, las hembras de tanto camarones como ostiones requieren más DHA y EPA.

ARA en dieta

Dado que el ARA es menor en tejidos de organismos de cultivo, una primera propuesta sería incrementar los niveles en el alimento. Lo anterior se ha intentado en varias especies de cultivo: algunos de estos resultados se pueden apreciar en la Tabla 5. Altos niveles de ARA en la dieta no siempre incrementaron los niveles de ARA en los tejidos: Varios trabajos reportan incremento de ARA en tejidos inversamente proporcional a niveles en la dieta (Castell *et al.*, 1994; Estévez *et al.*, 1999), otros reportan lo contrario (Bessonart *et al.*, 1999; Faulk y Holt, 2005; Delaporte *et al.*, 2006; Segueineau *et al.*, 2011). Cuando se afectó el nivel de ARA en tejidos, se observaron resultados contradictorios:

Tabla 5. Enriquecimiento de alimento con ARA en peces marinos y dulceacuícolas

Especie	ARA dieta	ARA tejidos	Efectos	Referencia
Rodaballo, larvas <i>S. maximus</i>	1.5, 3.8, 8.4% rotíferos y 2.5, 4.8, 7.9% <i>Artemia</i>	5-10%	Mayor acumulación de ARA en branquias, hígado, cerebro	Estévez <i>et al.</i> , 1999
Rodaballo, juveniles <i>S. maximus</i>	0, 1, 3, 5, 10 g kg ⁻¹ (0.1-5.2% alimento)	0.9, 1.7, 1.7, 5.4, 7.2%	Incremento supervivencia	Castell <i>et al.</i> , 1994
Halibut, adultos <i>H. hippoglossus</i>	0.4, 1.8%	1.7, 3.8% H	Mayor fertilización, eclosión.	Mazorra <i>et al.</i> , 2003
Lenguado, larvas <i>P. olivaceus</i>	0.3, 3.8, 7.5, 9.5, 10.6%	1.2-2% en TG y 2- 4.5% en FL	Incremento crecimiento y pigmentación	Estévez <i>et al.</i> , 1997
Lenguado, larvas <i>S. senegalensis</i>	1.3, 68 y 120 mg g ⁻¹ ms (0.2, 73.9, 14.8%)	1.3, 5.2 y 7.6%	Disminución de pigmentación con ARA	Villalta <i>et al.</i> , 2005
Lenguado, larvas <i>S. solea</i>	10, 20, 30% (3.6-9.6% <i>Artemia</i>)	6.0, 9.8, 10.1%	Pigmentación alterada y producción de PGE2	Lund <i>et al.</i> , 2007
Lenguado, larvas <i>S. solea</i>	0, 8, 16 y 24% (1.4-10.9% <i>Artemia</i>)	1.3, 1.5, 1.4, 1.6%	Pigmentación alterada y producción de PGE2	Lund <i>et al.</i> , 2008
Lenguado, larvas <i>P. dentatus</i>	0, 3, 6, 9, 12%	2.6, 1.8, 2.7, 2.5, 4.0% M	Mejor crecimiento y supervivencia a estrés	Willey <i>et al.</i> , 2003
Lenguado, adultos <i>P. olivaceus</i>	0, 0.1, 0.6, 1.2%	0.4, 1.7, 3.3% TG H y 1.7, 5.4, 8.6 FL H	Mejor desempeño con 0.6%	Furuita <i>et al.</i> , 2003
Robalo, adultos <i>D. labrax</i>	1.3, 4.8 mg g ⁻¹ ms	0.7, 3.0% FL, 16.7 y 29.5% en FI	Acumulación en distintos fosfolípidos y ceras	Bell <i>et al.</i> , 1997
Robalo, adultos <i>D. labrax</i>	0.4-4.6%	1.7-3.3% E	Mejor supervivencia larvaria, menor crecimiento	Asturiano <i>et al.</i> , 2001
Dorada, larva <i>S. aurata</i>	0.1 a 1.8% ms	2.0-5.2% FL y 1.9- 6.1% TG	Incrementa supervivencia y crecimiento	Bessonart <i>et al.</i> , 1999
Dorada, larva <i>S. aurata</i>	1.1, 2.1, 3.9 mg g ⁻¹ ms	2.2, 5.6, 7.4 mg g ⁻¹ ms	Incremento cortisol, supervivencia a estrés puntual, metamorfosis	Koven <i>et al.</i> , 2003
Dorada, larva <i>S. aurata</i>	1.5, 7.5 mg g ⁻¹ ms (1.5, 6.3%)	4.5, 9.3%	Disminución de cortisol, incremento Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	Van Anholt, 2004a

Palacios Mechetnov, E. 2019. Ácido Araquidónico en Organismos de Acuicultura Silvestres y Cultivados y su Relación con el Estrés. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 220-248.

Dorada, juvenil <i>S. aurata</i>	0.2, 3.9, 7.6, 11.2%	1.6-22.3% FL M y 0.1-6.9% TG M	Acumulación branquias, hígado e intestino	Fountoulaki <i>et al.</i> , 2003
Lubina, larva <i>M. saxatilis</i>	ARA:DHA de 0:2 a 7:25	3 a 21% mg g ⁻¹	Incrementa supervivencia, cortisol	Harel <i>et al.</i> , 2001
Limanda, larva <i>L. ferruginea</i>	0.7, 1.2, 2.2, 7.1% rotíferos	2.2-8.0%	Pigmentación alterada	Copeman <i>et al.</i> , 2002
Bacalao, larva <i>G. morhua</i>	2.0, 5.0, 7.6, 11.1% rotíferos	4.7, 8.0, 9.8, 11.4%	Incremento de PGE ₂ , sin efecto en pigmentación	Bransden <i>et al.</i> , 2005
Bacalao, larva <i>R. canadum</i>	10, 20% (1.2- 3.8% <i>Artemia</i>)	3.8-4.5%	Sin efecto en supervivencia o crecimiento	Faulk y Holt, 2005
Guppie, adulto <i>P. reticulata</i>	12.5, 25, 37.5 y 50 mg g ⁻¹ (13.8-33.6% alimento)	1.5, 4.4, 4.9, 5.4%	Recuperación disminuida después de un reto inmune. Incremento peso	Khozin-Goldberg <i>et al.</i> , 2006
Tilapia, adulto <i>O. mossambicus</i>	0.7, 3.1%	0.8, 1.1% B, 2.2, 2.5% R, 1.5, 1.8% M	Reduce Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa en respuesta a estrés, osmorregulación	Van Anholt <i>et al.</i> , 2004b

Niveles en tejidos para todo el organismo, excepto donde se indica (H = huevos, M = músculo, E = esperma, FI = fosfatidilinositol). NR = no reportado.

Niveles bajos de ARA podrían ser la causa de una respuesta inmune inferior en organismos de cultivo, un problema grave en acuicultura donde los organismos se cultivan en altas densidades y son altamente susceptibles a infecciones. Niveles intermedios de ARA por lo general tienen efectos positivos sobre crecimiento y supervivencia durante el cultivo (Bell y Sargent, 2003). Los niveles más altos de ARA no siempre resultaron en mejor calidad o desempeño y las larvas de lenguado alimentadas con altos niveles de ARA presentaron por lo general, alteraciones de la pigmentación, pero por lo general incluir más ARA en la dieta, mejoró la tolerancia a algún tipo de estresor natural (inmune, reproducción, eclosión, etc.) o ambiental (salinidad, temperatura, densidad, etc.).

Tabla 6. Enriquecimiento de alimento con ARA en peces crustáceos (C) y moluscos (M)

	Especie	ARA dieta	ARA tejidos	Efectos	Referencia
C	Camarón tigre Juvenil <i>P. monodon</i>	0-18.5%	0.8-14.3 en H	Disminuye crecimiento	Glencross y Smith, 2001
	Camarón blanco Adulto <i>L. vannamei</i>	0.9, 4.7, 12.4%	3.61, 6.4, 9.3% G, 3.6, 4.6, 5.7% H	Mejor reproducción con nivel intermedio, desoves con mayor tolerancia con nivel alto	Xu <i>et al.</i> , 2017
	Camarón blanco Juvenil <i>L. vannamei</i>	0.8, 3.2%	8.2, 15.1% TG y 6.4, 14.0% FL HF	Incremento de PGE ₂ , disminución de tiempo de coagulación, glucosa, lactato	Aguilar <i>et al.</i> , 2012
	Almeja Larva purpuratos	0.-3.2%	0.8-1.3%	Sin efecto crecimiento o supervivencia.	Farías <i>et al.</i> , 2003
	Almeja Larva <i>P. magellanicus</i>	0.4, 1.1, 3.5% (0.3-6.6 mg g ⁻¹ ms)	1.2, 2.4, 5.0 % (0.02-1.3 µg larva ⁻¹)	Crecimiento y supervivencia mayor en dieta intermedia	Pernet y Tremblay, 2004
	Ostión Adulto <i>C. gigas</i>	0, 0.25, 0.41 µg ml ⁻¹	6.2, 15.3, 19.7% FL B	Incremento de granulocitos, hialinocitos y agranulocitos	Delaporte <i>et al.</i> , 2006
	Ostión Adulto <i>C. gigas</i>	0, 0.25, 0.41 µg ml ⁻¹	1.0, 4.1, 7.5% TG y 2.3, 6.9, 9.3% FL	Incremento de PGE ₂ y capacidad antioxidante	Seguineau <i>et al.</i> , 2011
	Ostión Adulto <i>C. corteziensis</i>	0, 1.0, 9.0%	59-106 µg 100 g ⁻¹ TG 23.2-24.1 µg 100 g ⁻¹ FL	Incrementa PGE ₂ , maduración gonádica, mejor respuesta inmune intermedio	Hurtado <i>et al.</i> , 2009
	Ostión Juvenil <i>C. corteziensis</i>	0-11.3%	2.3-12.7%	Crecimiento	Rivero-Rodríguez <i>et al.</i> , 2007

Niveles en tejidos para todo el organismo, excepto donde se indica (G = Gónada, B = branquia, R = Riñón, H = hepatopáncreas, M = músculo, HF = hemolinfa). NR = no reportado.

Una consideración al enriquecimiento con ARA es que, en casi todos los trabajos citados, también fueron afectados los niveles de DHA y EPA. Es necesario realizar bioensayos aislando el efecto del ARA. En trabajos realizados en folículos *in vitro*, que tienen la ventaja de que no hay transporte desde otros tejidos y solo se proporcionó ARA, el ARA incremento la secreción de gonadotropina y la maduración folicular en robalo *D. labrax* (Sorbera *et al.*, 2001), la ovulación en *M. undulatus* (Patiño *et al.*, 2003), y la testosterona y los niveles de PGE₂ en pez dorado *C. aureatus* (Mercure y Van der Kraak, 1996). En branquias de trucha (*O. mykiss*), el ARA incremento la síntesis de distintas PG (Beckman y Mustafa, 1992).

Otro punto a considerar, es que los niveles de ARA son muy importantes en los FL, dado que de ahí se sintetizan las PG y eicosanoides. Sin embargo, los trabajos donde se reporta el ARA separando TG de FL son aún menores (Tabla 6). Los FL que se encuentra en la membrana celular, tienen funciones muy específicas, tales como control de apoptosis, regulación a cambios de salinidad, respuesta inmune. En particular el fosfatidilinositol (FI) está fuertemente enriquecido con ARA, donde puede llegar a constituir una tercera parte de todos los AG (Bell *et al.*, 1997; Mazorra *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003). El ARA presente en FI es el que se libera por medio de la enzima fosfolipasa A₂ para la síntesis de PG. En contraste, los TG se considera que son lípidos de reserva, donde se acumulan los ácidos grasos que provienen de la dieta y que no se usan por el momento. Lo anterior implica que el alimento enriquecido con ARA se acumula principalmente en TG dado que no se requiere. El ARA modula la síntesis y liberación de esteroides y es el principal precursor biológico de las PG y otros eicosanoides, afectando indirectamente procesos como la actividad de cromatóforos, la respuesta al estrés, la ovulación, la inducción al desove, la osmorregulación, la respuesta inmune, y en último término, el crecimiento, la supervivencia de los organismos.

Tabla 6. Comparación de HUFA (%) en TG y FL de peces marinos (PC), peces catádomos/anádromos (CA), y peces dulceacuícolas (PD) de origen silvestre o de cultivo.

	Organismo	HUFA	Silvestres		Cultivados		P	Referencia
			TG	FL	TG	FL		
P M	Pargo	ARA	2.6	8.4	0.5 *	2.6	TG B	Rueda <i>et al.</i> , 1997
	Adulto-músculo	EPA	0.9	5.3	8.2 *	7.7		
	<i>Pagrus pagrus</i>	DHA	32.9	40.2	5.8	39.0		
	Pez limón (amberjack)	ARA	1.5	4.2	0.7	1.8 +	FL B	Rodríguez- Barreto <i>et al.</i> , 2012
	Adulto-músculo	EPA	1.7	2.1	10.9	5.2 +		
	<i>Seriola dumerili</i>	DHA	9.2	36.5	10.0	31.6		
	Pez limón (amberjack)	ARA	2.5	4.7	0.7 *	1.0 +	TG B FL B	Rodríguez- Barreto <i>et al.</i> , 2012
	Adulto-hígado	EPA	1.4	2.5	7.3 *	5.5 +		
	<i>Seriola dumerili</i>	DHA	6.9	30.1	6.1	24.3		
	Pez limón (amberjack)	ARA	1.9	7.7	1.3 *	4.6 +	TG B FL B	Rodríguez- Barreto <i>et al.</i> , 2012
	Adulto-ovario	EPA	1.5	2.6	5.8 *	8.5 +		
	<i>Seriola dumerili</i>	DHA	12.4	34.7	21.2 *	32.4 +		
	Esturión	ARA	2.6	6.6	2.0	6.0		Wirth <i>et al.</i> , 2002 (a,b)
	Huevo	EPA	5.6	10.0	4.8	6.6		
	<i>Polyodon spathula</i>	DHA	8.1	13.8	6.2	12.6		
	Esturión	ARA	2.5	6.3	2.6	7.7		Gessner <i>et al.</i> , 2002 (a,b)
	Huevo	EPA	5.8	8.3	3.8	5.3		
	<i>Acipenser stellatus</i>	DHA	9.0	17.7	8.4	14.6		
	Pargo	ARA	2.1	4.0	1.1	2.3		Ogata <i>et al.</i> , 2004 (a)
	Juveniles	EPA	3.0	3.2	3.5	4.3		
	<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	DHA	11.6	23.5	6.4	18.0		
	Pargo	ARA	3.5	9.7	0.7	9.7		Ogata <i>et al.</i> , 2004 (a)
	Adultos-músculo	EPA	1.1	2.0	0.4	3.2		
	<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	DHA	4.1	22.0	0.6	16.9		
C A	Salmón juveniles	ARA	2.8	10.4	0.3	1.8		Ackman y Takeuchi, 1986 (a)
		EPA	2.1	5.5	1.4	6.6		
	<i>Salmo salar</i>	DHA	4.1	21.8	5.7	36.2		
P D	Pez gato (Catfish)	ARA	2.2	10.0	0.4 *	1.4 +	TG B FL B	Shirai <i>et al.</i> , 2002
	Adulto-músculo	EPA	2.3	6.1	2.8	7.6		
	<i>Silurus asotus</i>	DHA	4.9	19.0	7.7 *	25.7 +		
	Pez blanco Pátzcuaro	ARA	8.3	9.1	2.2 *	5.4 +	TG B FL B	Palacios <i>et al.</i> , 2007
	Huevo	EPA	4.0	4.1	3.6	3.2		

Palacios Mechetnov, E. 2019. Ácido Araquidónico en Organismos de Acuicultura Silvestres y Cultivados y su Relación con el Estrés. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 220-248.

	<i>Chirostoma estor</i>	DHA	21.8	27.9	33.9	35.1		
	Pez blanco Pátzcuaro	ARA	10.1	8.5	3.5 *	4.1 +	TG B	Palacios <i>et al.</i> , 2007
	Larva	EPA	4.5	2.7	3.6	2.1	FL B	
	<i>Chirostoma estor</i>	DHA	28.9	32.7	36.2	43.3		

Los datos se reportan como medias. Los asteriscos indican diferencia significativa ($P<0.05$) entre TG de silvestres y cultivados, excepto donde no se reportó (a). Las cruces indican diferencia significativa ($P<0.05$) entre FL de silvestres y cultivados, excepto donde no se reportó (b).

Por último, las PG derivadas del ARA son del tipo 2, tales como las PGE2 o la PGF2. Otros AG pueden ser el sustrato de las COX, produciendo PG que, por lo general, son antagónicas con las del tipo 2, como por ejemplo las PG del tipo 3 derivadas del EPA, que son antiinflamatorias (Samuelsson, 1982; Stanley, 2000; Simopoulos, 2002). Una alta relación de n-6 en relación a n-3 podría promover una mejor respuesta inmune hasta cierto grado, pero después podría inducir inflamación: dicha inflamación es muy común en la dieta de humanos, en particular los que consumen alimentos ricos en n-6 como pasa con la dieta de los mexicanos, y que se ha asociado a enfermedades inflamatorias crónicas como obesidad, diabetes y aterosclerosis (Simopoulos, 2002). De hecho, se ha propuesto que la relación de ARA:EPA es más importante que los niveles de ARA por sí solos (Sargent *et al.*, 1999; Bell y Sargent, 2003). Por ejemplo, Sargent y co. (1999) sugirieron una relación de DHA:EPA en el alimento de 2:1 para larvas de robalo y lenguado, pero que la relación EPA:ARA sea de 1:1 para robalo y 10:1 para lenguado. El DHA también es antiinflamatorio, dado que a partir del DHA se producen resolvinas y otros biolípidos con actividades que similar a los biolípidos producidos por el EPA, son antiinflamatorias.

Además de regular el sistema inmune, las PG también pueden controlar la ovulación actuando como mediadores a nivel del hipotálamo o glándula pituitaria (Ruggeri y Thoroughgood, 1985), la ovogénesis, el desarrollo gonádico (Jalabert, 1976; Martínez *et al.*, 1999), el desove (Stacey & Goetz, 1982) y la espermatogénesis (Rowley *et al.*, 2005) de varios invertebrados. También se ha propuesto que las PG previenen la fecundación poliespérmica (Stanley-Samuelson, 1994) y la fijación de las larvas (Rowley *et al.*, 2005) y su actividad como atrayentes y sincronizador durante la reproducción, al estilo de feromonas (Bjerselius y Olsen, 1993; Asturiano *et al.*, 2001). Una vez que ejercen su acción, las PG son rápidamente (30-90 segundos) metabolizadas (Samuelsson, 1982).

Palacios Mechetnov, E. 2019. Ácido Araquidónico en Organismos de Acuicultura Silvestres y Cultivados y su Relación con el Estrés. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisiones en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 220-248.

Conclusiones

Los niveles de inclusión de EPA y DHA en el alimento pueden incrementarse sin un efecto perjudicial evidente en la mayor parte de los organismos, con la limitante del costo de producción de alimento rico en HUFA n-3. Algunos organismos, como peces dulceacuícolas y camarones requieren mucho menos DHA, por lo menos durante la engorda, de lo que se ofrece actualmente en los alimentos comerciales. Disminuir los niveles de HUFA n-3 en el alimento para algunos organismos, además de disminuir costos, contribuye a disminuir el impacto de la pesquería de peces pelágicos, al no tener que incluirse en niveles tan elevados la harina y/o el aceite de pescado en los alimentos acuícolas. No obstante, una consideración adicional es la producción acuícola de alimentos para el humano, el cual también requiere HUFA n-3, por lo que se recomienda usar alimentos acuícolas terminales de enriquecimiento (finishing diets) acorde a cada especie.

El incremento de ARA en el alimento, hasta cierto punto, tiene efectos benéficos sobre los organismos en cultivo, pues puede compensar algunos efectos de estrés ambiental e inmune, y mejorar algunos parámetros reproductivos. Sin embargo, niveles de inclusión elevados pueden llegar a producir efectos nocivos que dependen del organismo, del estadio de desarrollo, de la forma de administración y del tejido, e incluso de los niveles de HUFA n-3. Aparentemente, en algunos organismos el efecto nocivo del ARA puede contrarrestarse si se acumula en triglicéridos, en algunos tejidos, o en algunos tipos de fosfolípidos.

Referencias

- Ackman, R. G., & Takeuchi, T. (1986). Comparison of fatty acids and lipids of smolting hatchery-fed and wild Atlantic salmon *Salmo salar*. *Lipids*, 21(2), 117–120
- Ackman, R.G., McLeod, C., Rakshet, S., & Misra, K.K. (2002). Lipids and fatty acids of five freshwater food fishes of India. *Journal of Food Lipids*, 9, 127–145.
- Aguilar, V., Racotta, I. S., Goytortúa, E., Wille, M., Sorgeloos, P., Civera, R., & Palacios, E. (2012). The influence of dietary arachidonic acid on the immune response and performance of Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at high stocking density. *Aquaculture Nutrition*, 18(3), 258–271
- Alasalvar, C., Taylor, K. D., Zubcov, E., Shahidi, F., & Alexis, M. (2002). Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chemistry*, 79(2), 145–150.
- Alava, V. R., Quintio, E. T., de Pedro, J. B., Priolo, F. M. P., Orozco, Z. G. A., & Wille, M. (2007). Lipids and fatty acids in wild and pond-reared mud crab *Scylla serrata* (Forsskal) during ovarian maturation and spawning. *Aquaculture Research*, 38(14), 1468–1477.
- Almeida, N.A.M., & Franco, M.R.B. (2007). Fatty acid composition of total lipids, neutral lipids and phospholipids in wild and farmed matrinxã (*Brycon cephalus*) in the Brazilian Amazon area. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2596–2603.
- Asturiano, J.F, Sorbera, L.A., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J., Navarro, J.C., Bromage, N. (2001). Reproductive performance in male European sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. fed two PUFA-enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture*, 194, 173–190.
- Bell, J. G., & Sargent, J. R. (2003). Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*, 218(1–4), 491–499.
- Bell, J. G., Farndale, B. M., Bruce, M. P., Navas, J. M., & Carillo, M. (1997). Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 149, 107–119.
- Bell, J. G., Tocher, D.R., Henderson, R. J., Dick, J.R., & Crampton, V.O. (2003). Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *Journal of Nutrition*, 133, 2793–2801.
- Bell, J. G., Preston, T., Henderson, R. J., Strachan, F., Bron, J. E., Cooper, K., & Morrison, D. J. (2007). Discrimination of wild and cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using chemical and isotopic analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 5934–5941.
- Beckman, B., & Mustafa, T. (1992). Arachidonic acid metabolism in gill homogenate and isolated gill cells from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: the effect of osmolality electrolytes and prolactin. *Fish Physiology and Biochemistry*, 10(3), 213–222.
- Bessonart, M., Izquierdo, M., Salhi, M., Hernández-Cruz, C., González, M., & Fernández-Palacios, H. (1999). Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture*, 179, 265–275.

- Bjerselius, R., & Olsen, K. H. (1993). A study of the olfactory sensitivity of crucian carp (*Carassius carassius*) and goldfish (*Carassius aureatus*) to 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and prostaglandin F2 α . *Chemical Senses*, 18, 427–436.
- Blanchet, C., Lucas, M., Julien, P., Morin, R., Gingras, S., & Dewailly, É. (2005). Fatty acid composition of wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids*, 40(5), 529–531.
- Bransden, M. P., Butterfield, G. M., Walden, J., McEvoy, & Bell, J. G. (2005). Tank colour and dietary arachidonic acid affects pigmentation, eicosanoid production and tissue fatty acid profile of larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 250, 328–340.
- Browdy, C., Seaborn, G., Atwood, H., Davis, D. A., Bullis, R. A., Samocha, T. M., Wirth, E., & Leffler, J. W. (2006). Comparison of pond production efficiency, fatty acid profiles, and contaminants in *Litopenaeus vannamei* fed organic plant-based and fish-meal-based diets. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(4), 437–451.
- Busetto, M. L., Moretti, V. M., Moreno-Rojas, J. M., Caprino, F., Giani, I., Malandra, R., Bellagamba, F., & Guillou, C. (2008). Authentication of farmed and wild turbot (*Psetta maxima*) by fatty acid and isotopic analyses combined with chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2742–2750.
- Castell, J. D., Bell, J. G., Tocher, D. R., & Sargent, J. R. (1994). Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 128, 315–333.
- Cejas, J. R., Almansa, E., Villamandos, J. E., Badía, P., Bolaños, A., & Lorenzo, A. (2003). Lipid and fatty acid composition of ovaries from wild fish and ovaries and eggs from captive fish of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture*, 216(1–4), 299–313.
- Copeman, L. A., Parrish, C. C., Brown, J. A., & Harel, M. (2002). Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture*, 210(1–4), 285–304.
- Coutteau, P., & Mourente, G. (1997). Lipid classes and their content of n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) in *Artemia franciscana* after hatching, HUFA-enrichment and subsequent starvation. *Marine Biology*, 130(1), 81–91.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert, C., Séguineau, C., & Samain, J.F. (2006). Impact of 20:4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids*, 41(6), 567–576.
- Estévez, A., Ishikawa, M., & Kanazawa, A. (1997). Effects of arachidonic acid on pigmentation and fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). *Aquaculture Research*, 28(4), 279–289.
- Estévez, A., McEvoy, L., Bell, J., & Sargent, J. (1999). Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture*, 180, 321–343.

- Farías, A., Bell, J.G., Uriarte, I., Sargent, J.R. (2003). Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) larvae: effects of diet and temperature, *Aquaculture*, 228, 289–305.
- Faulk, C. K., & Holt, G. J. (2005). Advances in rearing cobia *Rachycentron canadum* larvae in recirculating aquaculture systems: Live prey enrichment and greenwater culture. *Aquaculture*, 249(1–4), 231–243.
- Fountoulaki, E., Alexis, M., Nengas, I., & Venou, B. (2003). Effects of dietary arachidonic acid (20:4n-6), on growth, body composition, and tissue fatty acid profile of gilthead bream fingerlings (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 225, 309–323.
- Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Hurtado, R., Grigorakis, K., Karacostas, I., Nengas, I., Rigos, G., Kotzamanis, Y., Venou, B., & Alexis, M. (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.
- Furuita, H., Yamamoto, T., Shima, T., Suzuki, N., & Takeuchi, T. (2003). Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 220, 725–735.
- Gao, J., Koshio, S., Nguyen, B. T., Wang, W., & Cao, X. (2012). Comparative studies on lipid profiles and amino acid composition of wild and cultured Dojo loach *Misgurnus anguillicaudatus* obtained from southern Japan. *Fisheries Science*, 78(6), 1331–1336.
- Gessner, J., Wirth, M., Kirschbaum, F., Kruger, A., & Patriche, N. (2002). Caviar composition in wild and cultured sturgeons – impact of food sources on fatty acid composition and contaminant load. *Journal of Applied Ichthyology*, 18(4–6), 665–672.
- Glencross, B. D., & Smith, D. M. (2001). A study of the arachidonic acid requirements of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition*, 7(1), 59–69.
- Glencross, B. D., Hawkins, W.E., & Curnow, J.G. (2003). Restoration of the fatty acid composition of red seabream (*Pagrus auratus*) using a fish oil finishing diet after grow-out on plant oil based diets. *Aquaculture Nutrition*, 9, 409–418.
- Grigorakis, K., Alexis, M. N., Taylor, K. D. A., & Hole, M. (2002). Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(5), 477–484.
- Harel, M., Gavasso, S., Leshin, J., Gubernatis, A., & Place, A. R. (2001). The effect of tissue docosahexaenoic and arachidonic acids levels on hypersaline tolerance and leucocyte composition in striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 24(2), 113–123.
- Hurtado, M. A., Reza, M., Ibarra, A. M., Wille, M., Sorgeloos, P., Soudant, P., & Palacios, E. (2009). Arachidonic acid (20:4n-6) effect on reproduction, immunology, and prostaglandin E2 levels in *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). *Aquaculture*, 294(3–4), 300–305.

- Jalabert, B. (1976). *In vitro* oocytes maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), northern pike (*Esox lucius*) and goldfish (*Carassius auratus*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 33, 974–988.
- Jankowska, B., Zakęś, Z., Żmijewski, T., & Szczepkowski, M. (2008). Fatty acid composition of wild and cultured northern pike (*Esox lucius*). Journal of Applied Ichthyology, 24(2), 196–201.
- Jankowska, B., Zakęś, Z., Żmijewski, T., & Szczepkowski, M. (2010). Fatty acid profile of muscles, liver and mesenteric fat in wild and reared perch (*Perca fluviatilis* L.). Food Chemistry, 118(3), 764–768.
- Karapanagiotidis, I. T., Bell, M. V., Little, D. C., Yakupitiyage, A., & Rakshit, S. K. (2006). Polyunsaturated fatty acid content of wild and farmed tilapias in Thailand: Effect of aquaculture practices and implications for human nutrition. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(12), 4304–4310.
- Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Pimenta-Leibowitz, M., Nechev, J., Zilberg, D. (2006). Feeding with arachidonic acid-rich triacylglycerols from the microalga *Parietochloris incisa* improved recovery of guppies from infection with *Tetrahymena* sp. Aquaculture 255, 142–150.
- Koven, W., van Anholt, R., Lutzky, S., Ben Atia, I., Nixon, O., Ron, B., & Tandler, A. (2003). The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival, and cortisol levels in different-age gilthead seabream larvae (*Sparus auratus*) exposed to handling or daily salinity change. Aquaculture, 228, 307–320.
- Lund, I., Steenfeldt, S. J., & Hansen, B. W. (2007). Effect of dietary arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on survival, growth and pigmentation in larvae of common sole (*Solea solea* L.). Aquaculture, 273(4), 532–544.
- Lund, I., Steenfeldt, S. J., Suhr, K. I., & Hansen, B. W. (2008). A comparison of fatty acid composition and quality aspects of eggs and larvae from cultured and wild broodstock of common sole (*Solea solea* L.). Aquaculture Nutrition, 14(6), 544–555.
- Mazorra, C., Bruce, M., Bell, J. G., Davie, A., Alorend, E., Jordan, N., Rees, J., Papanikos, N., Porter, M., & Bromage, N. (2003). Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Aquaculture, 227, 21–33.
- Mercure, F., Van Der Kraak, G. (1996). Mechanisms of action of free arachidonic acid on ovarian steroid production in the goldfish. General and Comparative Endocrinology, 102(1), 130–140.
- Meunpol, O., Meejing, P., & Piyatiratitivorakul, S. (2005). Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. Aquaculture Research, 36(12), 1216–1225.
- Mnari, A., Bouhlel, I., Chraief, I., Hammami, M., Romdhane, M. S., El Cafsi, M., & Chaouch, A. (2007). Fatty acids in muscles and liver of Tunisian wild and farmed gilthead sea bream, *Sparus aurata*. Food Chemistry, 100(4), 1393–1397.
- Morrison, D. J., Preston, T., Bron, J. E., Hemderson, R. J., Cooper, K., Strachan, F., & Bell, J. G. (2007). Authenticating production origin of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by Chemical and Isotopic Fingerprinting. Lipids, 42(6), 537–545.
- Mourete, G., & Bell, J.G. (2006). Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth

- study: Effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Comparative Biochemistry and Physiology* 145B, 389–399.
- Navas, J. M., Bruce, M., Thrush, M., Farndale, B. M., Bromage, N., Zanuy, S., Carrillo, M., Bell, J. G., & Ramos, J. (1997). The impact of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass. *Journal of Fish Biology*, 51, 760–773.
- Ogata, H.Y., Emata, A.C., Garibay, E.S., Furuita, H. (2004). Fatty acid composition of five candidate aquaculture species in central Philippines. *Aquaculture*, 236, 361–375.
- Olsson, G. B., Olsen, R. L., Carlehög, M., & Ofstad, R. (2003). Seasonal variations in chemical and sensory characteristics of farmed and wild Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 217(1–4), 191–205.
- Orban, E., Nevigato, T., Lena, G. Di, Casini, I., & Marzetti, A. (2003). Differentiation in the lipid quality of wild and farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Food Science*, 68(1), 128–132.
- Ouraji, H., Fereidoni, A. E., Shayegan, M., & Asil, S. M. (2011). Comparison of fatty acid composition between farmed and wild Indian white shrimps, *Fenneropenaeus indicus*. *Food and Nutrition Sciences*, 02(08), 824–829.
- Ozaki, Y., Koga, H., Takahashi, T., Adachi, S., & Yamauchi, K. (2008). Lipid content and fatty acid composition of muscle, liver, ovary and eggs of captive-reared and wild silver Japanese eel *Anguilla japonica* during artificial maturation. *Fisheries Science*, 74(2), 362–371.
- Palacios, E., Racotta, I. S., Aparicio, B., Arjona, O., & Martínez-Palacios, C. A. (2007). Lipid classes and fatty acids during embryogenesis of captive and wild silverside (*Chirostoma estor estor*) from Pátzcuaro Lake. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33(1), 81–91.
- Patiño, R., Yoshizaki, G., Bolamba, D., & Thomas, P. (2003). Role of arachidonic acid and protein kinase C during maturation-inducing hormone-dependent meiotic resumption and ovulation in ovarian follicles of Atlantic Croaker. *Biology of Reproduction*, 68, 516–523.
- Pernet, F. & Tremblay, R. (2004). Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 310, 73–86.
- Place, A. R. (1992). Comparative aspects of lipid digestion and absorption: physiological correlates of wax ester digestion. *American Physiological Society*, 31, 464–471.
- Rivero-Rodriguez, S., Beaumont, A.R., Lora-Vilchis, M.C. (2007). The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. *Aquaculture*, 263, 199–210.
- Rodríguez, C., Acosta, C., Badía, P., Cejas, J. R., Santamaría, F. J., & Lorenzo, A. (2004). Assessment of lipid and essential fatty acids requirements of black seabream (*Spondylusoma cantharus*) by comparison of lipid composition in muscle and liver of wild and captive adult fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 139(4), 619–629.

- Rodríguez-Barreto, D., Jerez, S., Cejas, J. R., Martin, M. V., Acosta, N. G., Bolaños, A., & Lorenzo, A. (2012). Comparative study of lipid and fatty acid composition in different tissues of wild and cultured female broodstock of greater amberjack (*Seriola dumerili*). *Aquaculture*, 360–361, 1–9.
- Rowley, A.F., Vogan, C.L., Taylor, G.W., & Clare, A.S. (2005). Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *The Journal of Experimental Biology*, 208, 3–14.
- Rueda, F. M., Hernández, M. D., Egea, M. A., Aguado, F., García, B., & Martínez, F. J. (2001). Differences in tissue fatty acid composition between reared and wild sharpsnout sea bream, *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). *British Journal of Nutrition*, 86(5), 617–622.
- Rueda, F. M., Lopez, J. A., Martinez, F. J., Zamora, S., Divanach, P., & Kentouri, M. (1997). Fatty acids in muscle of wild and farmed red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture Nutrition*, 3(3), 161–165.
- Ruggeri, B., & Thoroughgood, C. A. (1985). Prostaglandins in aquatic fauna: a comprehensive review. *Marine Ecology Progress Series*, 23, 301–306.
- Salze, G., Tocher, D. R., Roy, W. J., & Robertson, D. A. (2005). Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquaculture Research*, 36(15), 1488–1499.
- Samuelsson 1982
- Sargent, J.R., Gatten, R.R., & McIntosh, R. (1977). Wax esters in the marine environment – their occurrence, formation, transformation and ultimate fates. *Marine Chemistry*, 5, 573–584.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., & Estévez, A. (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177(1–4), 191–199.
- Seguineau, C., Racotta, I.S., Palacios, E., Delaporte, M., Moal, J., & Soudant, P. (2011). The influence of dietary supplementation of arachidonic acid on prostaglandin production and oxidative stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 160A, 87–93
- Shirai, N., Suzuki, H., Tokairin, S., Ehara, H., & Wada, S. (2002). Dietary and seasonal effects on the dorsal meat lipid composition of Japanese (*Silurus asotus*) and Thai catfish (*Clarias macrocephalus* and hybrid *Clarias macrocephalus* and *Clarias galipinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 132(3), 609–619.
- Simopoulos, A.P. (2002). The importance of the ratio omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*, 56, 365–379.
- Sorbera, L. A., Francisco Asturiano, J., Carrillo, M., & Zanuy, S. (2001). Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, 64(1), 382–389.
- Stacey, N. E., & Goetz, F. W. (1982). Role of prostaglandins in fish reproduction. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39(1), 92–98.
- Stanley, D.W. (2000). *Eicosanoids in Invertebrate Signal Transduction Systems*. Princeton University Press. First Edition. The United States of America. 277 pp.
- Stanley-Samuelson, D.W. (1994). The biological significance of prostaglandins and related eicosanoids in invertebrates. *American Zoologist*, 34, 589–598.

- Suzuki, H., Okazaki, K., Hayakawa, S., Wada, S., & Tamura, S. (1986). Influence of commercial dietary fatty acids on polyunsaturated fatty acids of cultured freshwater fish and comparison with those of wild fish of the same species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(1), 58–60.
- Tanaka, T., Iwawaki, D., Sakamoto, M., Takai, Y., Morishige, J., Murakami, K., & Satouchi, K. (2003). Mechanisms of accumulation of arachidonate in phosphatidylinositol in yellowtail. A comparative study of acylation systems of phospholipids in rat and the fish species *Seriola quinqueradiata*. *European Journal of Biochemistry*, 270(7), 1466–1473.
- Tocher, D. R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 41(5), 717–732.
- Van Anholt, R. D., Koven, W. M., Lutzky, S., & Wendelaar Bonga, S. E. (2004a). Dietary supplementation with arachidonic acid alters the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 238, 369–383.
- Van Anholt, R. D., Spanings, F.A.T., Koven, W. M., Lutzky, S., & Wendelaar Bonga, S. E. (2004b). Dietary supplementation with arachidonic acid in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) reveals physiological effects not mediated by prostaglandins. *General and Comparative Endocrinology*, 139, 215–226.
- Villalta, M., Estévez, A., & Bransden, M. P. (2005). Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 245, 193–209.
- Vite N., Arjona O., Morales-Bojorquez E, Mascaro, M., Simoes, N., & Palacios E. (2014). Assessment of lipid classes and fatty acid levels in wild newborn seahorses (*Hippocampus erectus*) (Perry 1810): implications for survival and growth in aquarium culture. *Marine, Freshwater Behaviour & Physiology*, 47(6), 401–413.
- Wallis, J.W., Watts, J.L., & Browse, J. (2002). Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends in Biochemical Sciences*, 27(9), 467–473.
- Wiley, S., Bengtson, D. A., & Harel, M. (2003). Arachidonic acid requirements in larval summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Aquaculture International*, 11, 131–149.
- Wirth, M., Kirschbaum, F., Gessner, J., Williot, P., Patriche, N., & Billard, R. (2002). Fatty acid composition in sturgeon caviar from different species: Comparing wild and farmed origins. *International Review of Hydrobiology*, 87(5–6), 629–636.
- Wu, X., Cheng, Y., Sui, L., Yang, X., Nan, T., & Wang, J. (2007). Biochemical composition of pond-reared and lake-stocked Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) broodstock. *Aquaculture Research*, 38(14), 1459–1467.
- Wu, X., Cheng, Y., Zeng, C., Wang, C., & Yang, X. (2010). Reproductive performance and offspring quality of wild-caught and pond-reared swimming crab *Portunus trituberculatus* broodstock. *Aquaculture*, 301, 78–84.
- Xu, H., Zhang, Y., Luo, K., Meng, X., Luan, S., Cao, B., Chen, B., Liang, M., & Kong, J. (2017). Arachidonic acid in diets for early maturation stages enhances the final reproductive performances of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 479, 556–563.

- Yildiz, M., Şener, E., & Timur, M. (2008). Effects of differences in diet and seasonal changes on the fatty acid composition in fillets from farmed and wild sea bream (*Sparus aurata* L.) and sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *International Journal of Food Science & Technology*, 43(5), 853–858.

Biosynthesis of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Aquatic Invertebrates: Applications in Aquaculture Nutrition

Óscar Monroig

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

E-mail: oscar.monroig@csic.es

Abstract

Aquatic invertebrates have some ability to biosynthesize long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) including the so-called “omega-3” (or n-3) fatty acids. This paper briefly overviews the elongase and desaturase enzymes responsible for LC-PUFA biosynthesis in aquatic invertebrates. Moreover, the paper will focus on two potential applications that knowledge on the molecular mechanisms of LC-PUFA biosynthesis in aquatic invertebrates can have in aquaculture nutrition. First, the complement and functions of elongase and desaturase enzymes existing in the common octopus *Octopus vulgaris* has allowed the identification of the essential fatty acids (EFA) for this species. This methodological approach provides direct evidence of the enzymatic capacity existing in a particular species and thus is very useful to establish which fatty acids must be provided in the diet to ensure normal growth and survival. Second, the existence of complete enzymatic activities enabling the endogenous production of n-3 LC-PUFA in some aquatic invertebrates implies that their culture on low nutritional value (i.e. low n-3 LC-PUFA) materials including waste streams, can lead to the production of highly nutritious, n-3 rich meals for aquafeed. This paper will discuss the potential to explore this novel strategy in polychaetes, provided their enzymatic capacity for LC-PUFA biosynthesis, along other biological features.

Keywords: Aquatic invertebrates, long-chain polyunsaturated fatty acids, PUFA elongase, front-end desaturase, ω x desaturase

Introduction

Marine invertebrates are attracting a great deal of attention in aquaculture nutrition, especially with regards to their essential nutrient profiles. Many aquatic invertebrates are good sources of long-chain (C₂₀₋₂₄) polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA), particularly the so-called “omega-3” (ω 3 or n-3) including eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3). Such n-3 LC-PUFA are health-promoting compounds in a variety of human conditions including cardiovascular and other inflammatory disorders, neural development and neurological pathologies (Brouwer, Geelen & Katan 2006; Innis 2007; Ruxton *et al.* 2007; Campoy *et al.* 2012; Delgado-Lista *et al.* 2012; Calder 2014, 2018) EPA and DHA, along arachidonic acid (ARA, 20:4n-6), are regarded as physiologically important fatty acids being key components of cell membranes in which they determined their properties and acting as precursors of biologically active molecules (eicosanoids) (Stubbs & Anthony 1984).

In addition to dietary input, LC-PUFA can be also produced endogenously (biosynthesis) in animals *via* aerobic enzymatic reactions catalyzed by two types of enzymes, namely fatty acyl desaturases and elongases. These pathways are fairly well understood in vertebrates (Guillou *et al.* 2010) and arguably, the molecular control and basis of LC-PUFA is better understood in teleost fish than in mammals (Monroig, Tocher & Castro 2018). Aquatic invertebrates have active LC-PUFA biosynthetic pathways and specific genes encoding desaturases and elongases involved in invertebrate LC-PUFA biosynthesis have been investigated in the last decade (see Monroig & Kabeya 2018). While the specific desaturase and elongase gene families so far described in aquatic invertebrates have been described in comprehensive reviews (Monroig, Tocher & Navarro 2013; Monroig & Kabeya 2018), this paper will briefly overview the LC-PUFA biosynthesizing elongase and desaturase genes found in aquatic invertebrates for the purposes of providing an adequate background. Moreover, the paper will focus on two applications that knowledge on the molecular mechanisms of LC-PUFA biosynthesis in aquatic invertebrates offers to aquaculture nutrition.

One first application of research on aquatic invertebrate LC-PUFA biosynthesis in aquaculture nutrition is associated with the capacity that knowledge on these pathways offers for the identification of essential fatty acids (EFA). EFA are defined as fatty acids that cannot be biosynthesized from other precursors or, when conversions are possible, they do not occur at sufficient physiological rates to satisfy demand. Consequently, EFA must be supplied in the diet to prevent deficiency symptoms (NRC 2011). As occurs for any animal (Bell & Tocher 2009), the complement and functions of elongase and desaturase enzymes existing in a particular aquatic invertebrate species allows to establish the EFA for that species. This methodological approach is especially adequate in species or developmental stages in which more empirical approaches involving feeding trials with dietary presence/absence of potential EFA cannot be tested due to the difficulty of having viable animals during the experimental period and/or the ability to manipulate fatty acid content in the experimental diet. This paper will review a case study on the common octopus *Octopus vulgaris*, a commercially important species in the Mediterranean, and whose LC-PUFA biosynthetic pathways have been extensively investigated in the last few years (Monroig *et al.* 2012a, b, 2017; Reis *et al.*, 2014.; Garrido *et al.* 2019).

A second aspect illustrating the importance that research on LC-PUFA biosynthesis in aquatic invertebrates has for aquaculture nutrition is related with the capacity of many invertebrates to be net producers of n-3 LC-PUFA. Historically, primary production of n-3 LC-PUFA and their shorter chain (C₁₈) polyunsaturated fatty acid (PUFA) precursors in the marine environment was postulated to occur mainly by the action of photosynthetic microalgae, heterotrophic protists and bacteria (Pereira, Leonard & Mukerji 2003). Higher trophic level organisms such as fish cannot biosynthesize the C₁₈ PUFA linoleic acid (LA, 18:2n-6) and α -linolenic acid (ALA, 18:3n-3), and consequently LA and ALA are generally regarded as dietary EFA for vertebrates. However, some fish species can utilize dietary C₁₈ PUFA and convert them into LC-PUFA, and thus play a role in “trophic upgrading” (Bell & Tocher 2009). As described below, a recent study has revealed that multiple invertebrates possess a particular type of desaturase enzymes that enable them to produce LC-PUFA from saturated fatty acid precursors and, similarly to single-cell microorganisms, can also contribute to primary production of n-3 LC-PUFA (Kabeya *et al.* 2018). These results imply

Monroig, O. 2019. Biosynthesis of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Aquatic Invertebrates: Applications in Aquaculture Nutrition. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds). Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 249-270.

that some invertebrate species can be cultured intensively to provide biomasses that constitute novel and highly nutritious ingredients for aquafeeds. Polychaetes, along being among the aquatic invertebrates with genes enabling the *de novo* biosynthesis of n-3 LC-PUFA (Kabeya *et al.* 2018), have other biological features that make them excellent candidates to explore the abovementioned strategy leading to production of novel n-3 rich products. This paper will review our current understanding of n-3 LC-PUFA biosynthesizing capacity of polychaetes and identify species with high potential in which to apply such innovative approaches.

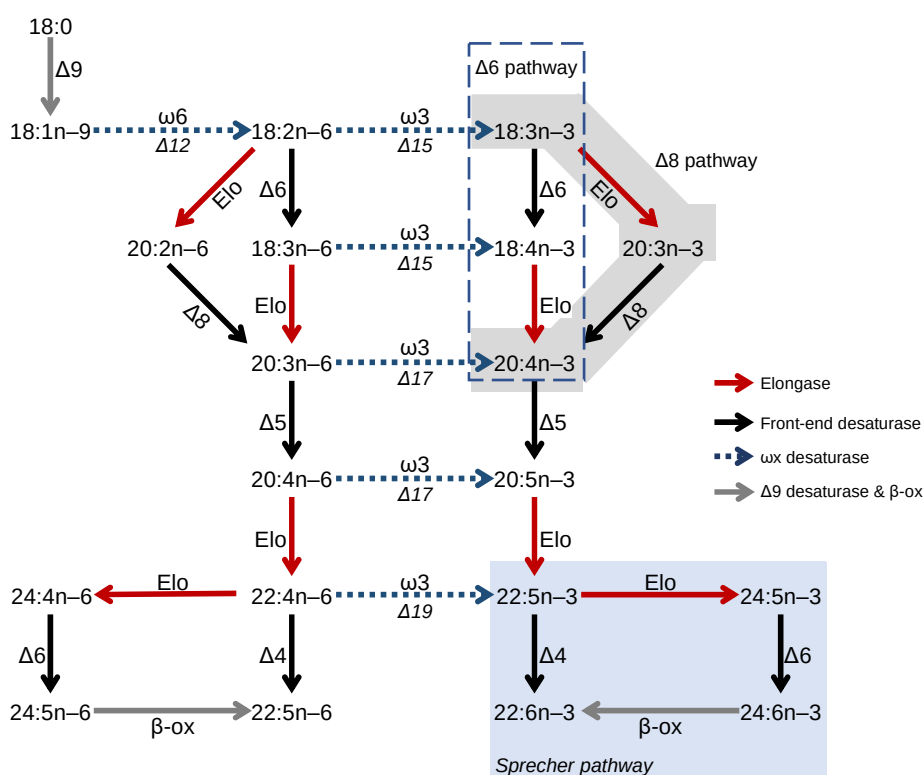


Fig. 1. Biosynthetic pathways of polyunsaturated fatty acids. Desaturation reactions are denoted with “ω” or “Δ” to refer, respectively, the carbon position at which the new double bond locates from the methyl (ω; dotted blue arrows) and front (Δ) ends (black solid arrows) of the precursor fatty acid. Elongation reactions are denoted with “Elo” (red arrows). Biosynthesis of 20:4n-3 (eicosatetraenoic acid) from 18:3n-3 (α-linolenic acid) can proceed via the “Δ8 pathway” (grey background) and the “Δ6 pathway” (green background). Both

pathways can also proceed from 18:2n-6 (linoleic acid) to produce 20:3n-6 (dihomo- γ -linolenic) (not indicated). Reactions along the “Sprecher pathway” are highlighted in grey background. Note that 20:2n-6 can be converted to 20:3n-3 through a $\Delta 15$ desaturation catalyzed by an $\omega 3$ desaturase (not shown).

Elongases and desaturases involved in the LC-PUFA biosynthetic pathways of aquatic invertebrates

The genes encoding elongases and desaturases responsible for the biosynthetic pathways of LC-PUFA biosynthesis in aquatic invertebrates had been barely investigated in comparison to those from vertebrates including fish (Castro, Tocher & Monroig 2016). Research conducted in the last decade has shown that aquatic invertebrates also have elongases and desaturases that actively contribute to LC-PUFA biosynthesis (Fig. 1). Comprehensive reviews on this topic provide a systematic assessment of repertoire and functions of elongases and desaturases involved in the LC-PUFA biosynthesis of aquatic invertebrates (Monroig, Tocher & Navarro 2013; Monroig & Kabeya 2018). For the sake of providing the adequate context, the following sections provide a brief summary of our current understanding on occurrence and functions of these LC-PUFA biosynthesizing enzymes in aquatic invertebrates.

Elongases

Fatty acyl elongases or, more formally, elongation of very long-chain fatty acid (Elovl) proteins (Elovl) catalyze the condensation reaction in the elongation pathway resulting in an extension of the preexisting fatty acid by 2 carbons (Fig. 1) (Castro, Tocher & Monroig 2016). In vertebrates, the elongases Elovl2 and Elovl5 play central roles in LC-PUFA biosynthesis (Castro, Tocher & Monroig 2016). Moreover, Elovl4 is primarily involved in the biosynthesis of the very long-chain ($>C_{24}$) PUFA (VLC-PUFA) (Agbaga *et al.* 2008) but some vertebrate groups like teleosts have Elovl4 enzymes that can operate towards PUFA ranging from 18 to 22 carbons and therefore can further participate in the biosynthetic pathways of LC-PUFA like Elovl2 and Elovl5 (Monroig *et al.* 2010; Jin *et al.* 2017).

Monroig, O. 2019. Biosynthesis of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Aquatic Invertebrates: Applications in Aquaculture Nutrition. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds). *Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 249-270.

Invertebrates vary in their complement of genes encoding PUFA Elovl enzymes. Some groups like molluscs have a protein named “Elovl2/5” that represents an ancestral form of the what in vertebrates exists as two distinct proteins, namely Elovl2 and Elovl5 (Monroig *et al.* 2016a). Genes encoding Elovl2/5 have been characterized in cephalopods, gastropods and bivalves and, generally, this enzyme has affinity for C₁₈ and C₂₀ PUFA substrates (Liu *et al.* 2013; Monroig *et al.* 2016b; Ran *et al.* 2018). It is interesting to note that Elovl2/5 appears to be absent in other invertebrates such as crustaceans (Monroig & Kabeya 2018). In contrast, crustaceans (Lin *et al.* 2018), and also molluscs (Liu *et al.* 2014a; Monroig *et al.* 2017), feature *elovl4* genes with functions that are largely consistent to those of vertebrate orthologs as described above (Agbaga *et al.* 2008; Monroig *et al.* 2010; Jin *et al.* 2017). In addition to Elovl2/5 and Elovl4, “novel” Elovl with putative roles in PUFA elongation have been also described in some animal lineages (Monroig & Kabeya 2018). For instance, cnidarians have two Elovl-like enzymes termed “ElovlA” and “ElovlB” with unknown functions (Surm *et al.* 2018). Moreover, a novel Elovl has been functionally characterized in the razor clam *Sinonovacula constricta* (Ran *et al.* 2019). This protein, named “Elovl_c” (Ran *et al.* 2019), has the ability to elongate PUFA substrates ranging from 18 to 22 carbons to produce polyenes of up to 34 carbons (e.g. 34.5n-3), thus contributing to the biosynthesis of VLC-PUFA along the two Elovl4 enzymes present as well in *S. constricta* (Ran *et al.* 2019). Along molluscs and crustaceans, groups in which further *elovl* genes have been studied include sponges (Gold *et al.* 2017), cnidarians (Surm *et al.* 2018), echinoderms (Li *et al.* 2016) and invertebrate chordates such as sea squirt and amphioxus (Meyer *et al.* 2004; Monroig *et al.* 2016a).

Desaturases

Vertebrates possess aerobic desaturases involved in LC-PUFA biosynthesis that are termed “front-end” desaturases since they introduce new double bonds (unsaturations) between the carboxylic group (front end) and an existing double bond in the fatty acyl chain (Fig. 1). Fads1 and Fads2, two front-end desaturases found in vertebrates (Guillou *et al.* 2010; Castro, Tocher & Monroig 2016), typically have $\Delta 6$ and $\Delta 5$ desaturase activities, respectively, and consequently catalyze key reactions along the LC-PUFA biosynthetic pathways (Fig. 1)

Monroig, O. 2019. Biosynthesis of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Aquatic Invertebrates: Applications in Aquaculture Nutrition. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds). Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 249-270.

(Castro, Tocher & Monroig 2016). Other desaturase activities contained within Fads-like enzymes from vertebrates include $\Delta 8$ (e.g. Monroig, Li & Tocher 2011) and $\Delta 4$ (e.g. Oboh *et al.* 2017). It is important to note that front-end desaturases, irrespective of their Δ activity, are unable to bioconvert n-6 substrates into n-3 products. Consequently, the n-6 and n-3 LC-PUFA biosynthetic pathways operated by vertebrates proceed independently despite sharing the enzymes acting in analogous reactions along each pathway (Fig. 1).

Invertebrates have front-end desaturases with $\Delta 5$, $\Delta 6$ and $\Delta 8$ desaturase capacities but, in spite of their similar functional capacity to vertebrate Fads, their phylogenetic relationship has not yet been elucidated (Monroig & Kabeya 2018). The first front-end desaturase isolated and functional characterized from an aquatic invertebrate was that from *O. vulgaris* (Monroig *et al.* 2012a). While more detail will be given below, it is important to note that the *O. vulgaris* front-end desaturase is a $\Delta 5$ desaturase (Monroig *et al.* 2012a). Further $\Delta 5$ desaturases were subsequently discovered in the cephalopod *Sepia officinalis* (Monroig *et al.* 2016b), the gastropod *Haliotis discus hannai* (Li *et al.* 2013), and the bivalves *Chlamys nobilis* (Liu *et al.* 2014b) and *S. constricta* (Ran *et al.* 2018). Phylogenetic analysis of these desaturase sequences suggested they all belong to Clade A according to the classification proposed by Surm, Prentis & Pavasovic (2015). Alternatively, further front-end desaturases found in *C. nobilis* (Liu *et al.* 2014a) and *S. constricta* (Ran *et al.* 2018) belong to Clade B and were functionally characterized as $\Delta 8$ and $\Delta 6$ desaturases, respectively. Existence of multiple front-end desaturases in some molluscs such as *C. nobilis* (2) and *S. constricta* (3) enables them to carry out all desaturation reactions to biosynthesize ARA and EPA from LA and ALA, respectively (Fig. 1). The pathways for ARA and EPA biosynthesis can be initiated via two alternative pathways, namely the “ $\Delta 8$ pathway” in *C. nobilis* (Liu *et al.* 2014a) and “ $\Delta 6$ pathway” in *S. constricta* (Ran *et al.* 2018) (Fig. 1). Interestingly, the *S. constricta* $\Delta 6$ front-end desaturase, originally reported to have $\Delta 6$ desaturase activity towards the C₁₈ substrates LA (18:2n-6) and ALA (18:3n-3) (Ran *et al.* 2018), has been recently determined to exhibit $\Delta 6$ activity on 24:5n-3 to produce 24:6n-3, a key intermediate in the so-called “Sprecher pathway” (Fig. 1) (Ran *et al.* 2019). This pathway is the metabolic route accounting for the biosynthesis of DHA in mammals (Sprecher 2000) and teleost fish (Tocher *et al.* 2003; Oboh *et al.* 2017). Consequently, *S. constricta* represents the first mollusc in

which all enzymatic activities required to convert C₁₈ PUFA into LC-PUFA including DHA have been demonstrated through the combined action of four PUFA elongases Elovl2/5, Elovl4 (2) and Elovl_c, and two front-end desaturases (Δ 5 and Δ 6) (Ran *et al.* 2018, 2019).

A paradigm shifting study has recently demonstrated that a large variety of invertebrates including cnidarians, nematodes, molluscs, arthropods, annelids and rotifers, possess a type of desaturase called “omega desaturases” (ω x des) (Fig. 1) (Kabeya *et al.* 2018), enzymes typically found in plants, microalgae and fungi, and believed to be absent from most animals (Pereira, Leonard & Mukerji 2003). Selected ω x desaturases from cnidarians (*Acropora millepora*), rotifers (*Adineta vaga*), molluscs (*Patella vulgata*), annelids (*Platynereis dumerilii*), and arthropods (*Lepeophtheirus salmonis*) were functionally characterized confirming that animal ω x des include both ω 3 and ω 6 desaturases (Kabeya *et al.* 2018). On one hand, ω 3 des are enzymes that introduce double bonds 3 carbons from the methyl end group, and thus produce n-3 LC-PUFA by desaturating their corresponding n-6 precursors at Δ 15, Δ 17 and Δ 19 positions (Fig. 1). Moreover, another type of ω x des found in invertebrates exhibited Δ 12 activity and, rather than “ ω 6 des”, is more commonly known as “ Δ 12 desaturase”. Irrespective of nomenclatures, Kabeya *et al.* (2018) showed that *A. millepora* (cnidarian), *P. vulgata* (mollusc), *P. dumerilii* (polychaete annelid) and *L. salmonis* (crustacean arthropod), have two co-existing ω x des enzymes with Δ 12 and ω 3 desaturase activities (Fig. 1). More specifically, the animal Δ 12 desaturases have the ability to bioconvert oleic acid (OA, 18:1n-9) into LA (18:2n-6). Subsequently, the ω 3 des biosynthesizes ALA (18:3n-3) from LA via Δ 15 desaturation (Fig. 1). While this confirmed that the combined action of two distinct enzymes account for *de novo* biosynthesis of ALA (an n-3 C₁₈ PUFA), further functions demonstrated by animal ω 3 des showed that the biosynthesis of ω 3 fatty acids is not restricted to C₁₈ products but also extends to LC-PUFA with 20 and 22 carbons (Fig. 1). In addition to the Δ 15 desaturations involving the C₁₈ substrates 18:2n-6 and 18:3n-6, the ω 3 desaturases from *A. millepora*, *P. vulgata*, *P. dumerilii* and *L. salmonis*, were also able to desaturate C₂₀ (20:2n-6, 20:3n-6 and 20:4n-6) and C₂₂ (22:4n-6) PUFA substrates, constituting Δ 17 and Δ 19 desaturase activities, respectively (Fig. 1).

A different pattern that illustrates the functional diversity of ω x des from animals was found in the bdelloid rotifer *Adineta vaga*. *A. vaga* possesses three ω x des genes, two of which encoded enzymes that simultaneously contained $\Delta 12$, $\Delta 15$ and $\Delta 17$ activities, but lacked $\Delta 19$ desaturase capacity (Kabeya *et al.* 2018). Overall, irrespective of the two patterns observed (cnidarian/mollusc/polychaete/crustacean vs rotifer), it has become clear that, for many aquatic invertebrates, the n-3 and n-6 LC-PUFA biosynthetic pathways do not proceed independently as described above for vertebrates but rather are interconnected through multiple reactions mediated by $\omega 3$ desaturases (Fig. 1). The discovery of ω x des in aquatic invertebrates has important implications in a varied range of scientific disciplines, stemming from biochemistry and physiology, and expanding to biotechnology and ecology. In the context of this paper, the presence of ω x des in aquatic invertebrates is also highly relevant to aquaculture nutrition since it implies that some species can be cultured intensively to produce biomasses that constitute novel sources of highly nutritious (i.e. n-3 rich) raw materials for aquafeeds. This strategy can be applied to many different invertebrates but, as noted above, polychaetes are excellent candidates and a section below will review our currently knowledge on LC-PUFA biosynthesizing genes existing in these animals.

Identification of the EFA in farmed aquatic invertebrates: The case study of *Octopus vulgaris*

Investigations of the LC-PUFA biosynthesis in farmed fish have enabled the identification of EFA, compounds that must be provided in the diet to ensure normal growth and survival (Tocher 2015). It has been established that fish species vary in their capacity to convert C_{18} PUFA to LC-PUFA depending upon the complement of *fads* and *elovl* genes existing in that particular species (Castro, Tocher & Monroig 2016; Monroig, Tocher & Castro 2018). In general, freshwater fish have higher capacity to bioconvert of C_{18} into LC-PUFA than marine counterparts with the limited capacity of marine fish associated to deficiencies in one or more enzymatic activities of the LC-PUFA biosynthetic pathway (Tocher 2010; Monroig, Tocher & Castro 2018; Ishikawa *et al.* 2019). With a similar aim, understanding the full repertoire of desaturase and elongase genes existing in farmed species of aquatic invertebrates has prompted interest in recent years. One example in which the above methodological approach

Monroig, O. 2019. Biosynthesis of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Aquatic Invertebrates: Applications in Aquaculture Nutrition. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds). Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 249-270.

has been tested is the common octopus *O. vulgaris*, an important commercial species whose culture protocols for early developmental stages (paralarvae) have not yet been fully developed, with key issues such as adequate nutrition still unresolved (Navarro, Monroig & Sykes 2014). Previous studies suggested that certain LC-PUFA are EFA for *O. vulgaris* paralarvae (Navarro & Villanueva 2000, 2003). Due to the inherent difficulties in running nutritional trials with octopus paralarvae, the specific LC-PUFA that fulfil the physiological demands could not be established. Alternatively to feeding trials, EFA for *O. vulgaris* have been identified through the characterization of genes encoding desaturase and elongase enzymes involved in LC-PUFA biosynthesis (Monroig *et al.* 2012a,b, 2017, Garrido *et al.* 2019). First, a pioneer study reported on the molecular and functional characterization of a cDNA encoding a front-end desaturase from *O. vulgaris*. As mentioned above, this desaturase was demonstrated to have $\Delta 5$ desaturation capacity and was able to operate on both saturated and PUFA substrates (Monroig *et al.* 2012a). The octopus $\Delta 5$ desaturase was able to introduce a double bond on saturated fatty acids such as 16:0 (palmitic acid) and 18:0 (stearic acid), resulting in the production of 16:1n-11 and 18:1n-13, respectively (Monroig *et al.* 2012a). Additionally, the *O. vulgaris* $\Delta 5$ desaturase was able to produce ARA and EPA from 20:3n-6 and 20:4n-3, respectively. Considering the reference genome from *Octopus bimaculoides* (Albertin *et al.* 2015), the above described $\Delta 5$ desaturase represents the sole front-end desaturase of *O. vulgaris*. Therefore, it can be assumed that *O. vulgaris* lacks capacity for $\Delta 4$, $\Delta 6$ or $\Delta 8$ desaturation, all key enzymatic activities that are required at different steps along the LC-PUFA biosynthesis pathways (Fig. 1).

Subsequent studies aimed to investigate *elovl* genes with putative roles in LC-PUFA production. Monroig *et al.* (2012b) reported on the molecular and functional characterization of a full-length cDNA sequence encoding an Elov1 with high homology to vertebrate Elov12 and Elov15 enzymes. As indicated above, this protein was termed “Elov12/5”. The octopus Elov12/5 was able to elongate both n-3 and n-3 PUFA substrates of 18 and 20 carbons but did not show any activity towards C₂₂ PUFA substrates. This raised the question of whether *O. vulgaris* had other Elov1 enzymes with the ability to elongate C₂₂ PUFA. A third study investigated an ortholog of *elovl4* from *O. vulgaris* (Monroig *et al.* 2017). The results from this study confirmed the role of the *O. vulgaris* Elov14 in VLC-PUFA biosynthesis and also

Monroig, O. 2019. Biosynthesis of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Aquatic Invertebrates: Applications in Aquaculture Nutrition. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 249-270.

that this enzyme was able to elongate C₂₂ PUFA including 22:5n-3. The latter implied that the *O. vulgaris* Elovl4 could contribute to the Sprecher pathway (Sprecher 2000) but, unlike the razor clam *S. constricta* (Ran *et al.* 2019), biosynthesis of DHA through this route appeared to be unlikely in a species that apparently lacked $\Delta 6$ desaturases.

The results from the above studies confirmed that the activities of the octopus Elovl2/5 and Elovl4 ensure all elongation reactions needed to biosynthesize LC-PUFA from C₁₈ PUFA precursors. However, as noted above, the fact that the $\Delta 5$ desaturase (Monroig *et al.* 2012a) is likely to be the only front-end desaturase in *O. vulgaris* genome suggested that the LC-PUFA biosynthetic pathways are indeed truncated due to the absence key desaturase activities (i.e. $\Delta 4$, $\Delta 6$ and $\Delta 8$). Consequently, the functions demonstrated for the $\Delta 5$ desaturase, and the Elovl2/5 and Elovl4 elongases, suggested that ARA, EPA and DHA were indeed dietary EFA for *O. vulgaris* as originally hypothesized (Navarro & Villanueva 2000, 2003). On one hand, ARA and EPA, while produced, respectively, from 20:3n-6 and 20:4n-3 by the $\Delta 5$ desaturase, were regarded as EFA provided that the low abundance of these precursors in the diet of octopus could possibly meet the physiological demands. With regards to DHA, lack of front-end desaturases with $\Delta 6$ or $\Delta 4$ activities noted above suggested that DHA should be also considered as an EFA for *O. vulgaris*. While the conclusion about ARA and DHA essentiality for *O. vulgaris* remained unchanged, a recent study by Garrido *et al.* (2019) identified two ωx des genes that made us revise our view on the essential nature of EPA.

Two genes encoding ωx des with $\Delta 12$ and $\omega 3$ regioselectivities have been demonstrated to exist in *O. vulgaris* (Garrido *et al.* 2019). As described above for other invertebrates (Kabeya *et al.* 2018), the consecutive action of the $\Delta 12$ desaturase producing 18:2n-6 (LA) from 18:1n-9 (OA), and subsequently, the $\omega 3$ desaturase converting LA into 18:3n-3 (ALA) through a $\Delta 15$ desaturation (Fig. 1), enables the *de novo* biosynthesis of $\omega 3$ PUFA in *O. vulgaris* (Garrido *et al.* 2019). The *O. vulgaris* $\omega 3$ desaturase has $\Delta 15$, $\Delta 17$ and $\Delta 19$ desaturation activities, in agreement with functions reported for $\omega 3$ desaturases from *A. millepora*, *P. vulgata*, *P. dumerilii* and *L. salmonis* (Kabeya *et al.* 2018). Consequently, EPA should not be regarded as a dietary EFA for *O. vulgaris* since it can be biosynthesized from 18:3n-6 (γ -linolenic acid) via two alternative routes, namely $\Delta 15$ desaturation – elongation –

Monroig, O. 2019. Biosynthesis of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Aquatic Invertebrates: Applications in Aquaculture Nutrition. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds). Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 249-270.

$\Delta 5$ desaturation, and elongation – $\Delta 17$ desaturation – $\Delta 5$ desaturation (Fig. 1). Since 18:3n-6 occurs at very low concentrations in preys of *O. vulgaris* (Quintana *et al.* 2015; Lorenço *et al.* 2017) and it cannot be produced endogenously from 18:2n-6 due to the apparent lack of $\Delta 6$ desaturases (Fig. 1), it is reasonable to speculate that the above routes are unlikely to guarantee demands for EPA. However, EPA can also be biosynthesized directly from ARA, a pathway that seems to be active in *O. vulgaris* paralarvae that were able to take up and convert ^{14}C -labelled ARA into EPA (Garrido *et al.* 2019). Natural preys of *O. vulgaris* contain remarkable amounts of ARA (Lorenço *et al.* 2017) thus guaranteeing supply of precursor for EPA biosynthesis. Collectively, molecular evidence suggests that ARA and DHA are dietary EFA for *O. vulgaris* since endogenous production is not possible due to absence of key desaturase activities. On the contrary, *O. vulgaris* can biosynthesize EPA through a variety of routes and should not be regarded as an EFA for this species.

LC-PUFA biosynthesis by aquatic invertebrates grown for production of novel n-3 rich meals: The case study of polychaetes

Meals processed from marine invertebrates have been used successfully as ingredients in fish and shrimp feeds (Moren *et al.* 2006; Coman *et al.* 2007; Jiménez-Prada 2018), and thus have been regarded as alternative ingredients to fishmeals (FM) traditionally used in aquafeeds (Tacon & Metian 2008). Both FM and fish oil (FO) are finite raw materials and, with the rapid expansion of aquaculture limiting their availability and increasing cost, alternative ingredients derived from terrestrial plants and animals are currently used in aquafeed manufacturing (Tocher 2015). Unlike meals of terrestrial origin, marine invertebrate meals, like FM, contain important levels of lipids with high contents of n-3 LC-PUFA (NRC 2011). Importantly, in the context of the present paper, the existence of complete enzymatic complements of elongases and desaturases enabling *de novo* production of n-3 LC-PUFA in some aquatic invertebrates implies that their culture under adequate supply of biosynthetic precursors and under optimized physical-chemical conditions enhancing such pathways emerges as a highly innovative and promising strategy to produce highly nutritious and sustainably sourced n-3 rich ingredients for aquaculture. This section will focus on polychaetes provided their ability to grow on a range of materials including waste streams

Monroig, O. 2019. Biosynthesis of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Aquatic Invertebrates: Applications in Aquaculture Nutrition. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds). Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 249-270.

and production systems (Marques *et al.* 2017; Pajand *et al.* 2017; Seakamp 2017; Gómez, Hurtado & Orellana, 2019; Nederlof *et al.* 2019), as well as their adaptability to varying environmental conditions such as temperature, salinity and dissolved oxygen (Marques *et al.* 2018).

Polychaetes have active PUFA biosynthesizing systems as demonstrated in the lugworm *Arenicola marina* (Olive *et al.* 2009; Pairohakul 2013), the ragworm *Alitta (Nereis) virens* (Pairohakul 2013) and the clamworm *Perinereis aibuhitensis* (Lv *et al.* 2016). Previously, Pond *et al.* (2002) investigated the origin of LC-PUFA in two species of polychaetes, namely *Ridgea piscesae* and *Protis hydrothermica*, inhabiting deep-sea hydrothermal sites that, in contrast to most marine ecosystems, contain low levels of LC-PUFA as a consequence of the absence of photosynthetic primary producers. It was suggested that the abundance of LC-PUFA in *R. piscesae* and *P. hydrothermica* could partly be explained by the action of endogenous LC-PUFA biosynthesizing machineries (Pond *et al.* 2002). Subsequently, Olive and co-workers determined that *A. marina* had some ability to produce LC-PUFA endogenously via the $\Delta 8$ pathway (Fig. 1) judging from the abundance of two of its metabolic components (20:3n-6 and 20:4n-6), which could be only accounted for by the action of genes existing in the worm (Olive *et al.* 2009). In the same study, EPA was suggested to derive from ARA via a $\Delta 17$ desaturation (Olive *et al.* 2009). Indeed, an experimental closed system enabling quantification of PUFA fluxes showed that both *A. marina* and *A. virens* accumulated EPA (Pairohakul 2013). Further evidence confirming the biosynthetic capacity of *A. virens* was collected by supplementing pellets containing stable isotope labelled (^{13}C) palmitic acid (16:0). The results demonstrated the ability of *A. virens* for EPA biosynthesis (Pairohakul 2013).

The availability of good quality genomic and transcriptomic databases has now allowed us to clarify that the above conversions are actually due to the presence of endogenous fatty acyl elongase and desaturase genes existing in the polychaete genome. Evidence of putative front-end desaturases and PUFA elongases can be found in annelid reference genomes such as those of *Capitella teleta* and *Helobdella robusta* (<http://ensembl.org>). However, to the best

of our knowledge, no functionally characterized genes encoding PUFA elongases or front-

Monroig, O. 2019. Biosynthesis of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Aquatic Invertebrates: Applications in Aquaculture Nutrition. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds). Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 249-270.

end desaturases have been yet been reported in the literature. In contrast, ω x des genes have been demonstrated to exist in the deep sea giant tubeworm *Riftia pachyptila* (Liu *et al.* 2017) and the nereid polychaete *Platynereis dumerilii* (Kabeya *et al.* 2018). On one hand, the *R. pachyptila* ω x des was categorized as an ω 3 desaturase exhibiting exclusively Δ 15 desaturase capacity since it was able to transform C₁₈ n-6 PUFA into their corresponding n-3 products (Liu *et al.* 2017). According to the presence of two distinct ω x des genes in the closely related species of tube worm *Lamellibrachia satsuma*, it can be hypothesized that *R. pachyptila* also features, along the formerly characterized ω 3 (Δ 15) desaturase (Liu *et al.* 2017), at least one further ω x des gene with putative Δ 12 desaturase activity. Thus, the presence of two ω x des enzymes with Δ 12 and Δ 15 desaturase activities in *R. pachyptila* would enable this species the *de novo* production of ALA (Monroig & Kabeya 2018). However, the absence of desaturase activities such as Δ 17 or Δ 19 within the ω 3 desaturase characterized from *R. pachyptila* (Liu *et al.* 2017) would preclude the biosynthesis of n-3 LC-PUFA as described above for many invertebrates (Kabeya *et al.* 2018). Interestingly, the nereid *P. dumerilii*, the other polychaete in which ω x des genes have been functionally characterized (Kabeya *et al.* 2018), possesses a Δ 12 desaturase and a ω 3 desaturase, the latter having Δ 15, Δ 17 and Δ 19 desaturase activities (Kabeya *et al.* 2018). Assuming that the uncharacterized PUFA elongases and front-end desaturases found in polychaete genomes are confirmed to be functional, enzymatic capacities contained within ω x des imply that some nereid polychaetes are net producers of n-3 LC-PUFA and that such production can theoretically occur from materials devoid of PUFA.

In addition to having complete pathways for endogenous production of n-3 LC-PUFA, nereid polychaetes exhibit other interesting features that make them excellent candidates for exploring the production of novel sources of n-3 LC-PUFA in the form of biomasses or meals. Mass production of nereids such as *A. virens* (Olive 1999) and, to some extent *Hediste (Nereis) diversicolor* (Nesto *et al.* 2018), has been established to guarantee continued supply of animals. Moreover, polychaetes in general and nereids in particular, are commonly used for bioremediation in aquaculture waste streams (Marques *et al.* 2017; Pajand *et al.* 2017; Gómez, Hurtado & Orellana, 2019) due to their natural capacity to assimilate nutrients including lipids contained within particulate organic material (Bischoff, Fink & Waller 2009;

Monroig, O. 2019. Biosynthesis of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Aquatic Invertebrates: Applications in Aquaculture Nutrition. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds). Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 249-270.

Pajand *et al.* 2017; Seekamp 2017). Rather than merely accumulating nutrients present in waste streams, the presence of active LC-PUFA biosynthesizing systems enables polychaetes to improve the nutritional quality (trophic upgrading) by enhancing the LC-PUFA content as shown in *P. aibuhitensis* (Lv *et al.* 2016). Moreover, the extent to which enhancement of the LC-PUFA production capacity occurs is dependent upon the regulation of elongase and desaturase genes through diet (nutritional regulation) and environmental factors including temperature and salinity (Monroig & Kabeya 2018). While such factors have been demonstrated to regulate elongase and desaturase genes in aquatic animals like fish (Monroig, Tocher & Castro 2018) the adaptability of nereid polychaetes to larger ranges of temperatures and salinities in comparison to fish (Marques *et al.* 2018). This offers a unique opportunity to set up culture protocols leading to optimization of the LC-PUFA biosynthesis that ultimately leads to higher nutritional value (i.e. n-3 rich) products.

Concluding remarks

Currently available evidence demonstrates that aquatic invertebrates have active endogenous systems enabling them to produce LC-PUFA. One major conclusion is that the ability of aquatic invertebrates for PUFA biosynthesis varies among species as a result of the suit of enzymes and their specific activities. Genes encoding the PUFA elongases Elovl2/5 and Elovl4, and front-end desaturases with $\Delta 5$, $\Delta 6$ and $\Delta 8$ activities, have been characterized in a variety of invertebrates. Importantly, the recent discovery of ωx desaturases in multiple aquatic invertebrates has challenged the historically accepted dogma by which n-3 LC-PUFA were produced almost exclusive by single-cell microorganisms occupying lower trophic levels of the marine food web. Clearly, the biosynthetic pathways of LC-PUFA in aquatic invertebrates are remarkably diverse but our current understanding of the molecular mechanisms involved is still rather limited. Yet, knowledge collected in this area of research has been already applied in disciplines such as aquaculture nutrition as illustrated herein with two case studies. First, mapping the elongase and desaturase enzymatic complement in farmed species of aquatic animals allows the identification of the specific fatty acids that must be supplied pre-formed in the diet to ensure normal growth and survival. This experimental approach has been explored in the common octopus *O. vulgaris* but, clearly, it

can be applied to other species whose culture husbandry, particularly with regards to nutritional requirements, remains unresolved. Second, nereid polychaetes appear as excellent candidates to produce novel n-3 rich biomasses and/or meals by exploiting their capacity to thrive on waste materials from different origins and recycle nutrients such as fatty acids contained in them. Rather than just mere containers, polychaetes can enhance the nutritional value of fatty acids contained in materials they are grown in. This is possible by the presence of LC-PUFA biosynthesizing elongases and desaturases, particularly of the ω x des type discussed above. Nereid polychaetes thus arise as excellent candidate with high potential to explore strategies to produce of novel raw materials with high content in n-3 LC-PUFA following circular economy principles.

References

- Agbaga M.-P., Brush R.S., Mandal M.N.A., Henry K., Elliott M.H., Anderson R.E. (2008) Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 12843–12848.
- Albertin C.B., Simakov O., Mitros T., Wang Z.Y., Pungor J.R., Edsinger-Gonzales E., Brenner S., Ragsdale C.W., Rokhsar D.S. (2015) The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties. *Nature* **524**, 220–224.
- Bell M.V., Tocher D.R. (2009) Biosynthesis of fatty acids: general principles and new directions. In: Arts M.T., Brett M., Kainz M. (Eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 211–236.
- Bischoff A.A., Fink P., Waller U. (2009) The fatty acid composition of *Nereis diversicolor* cultured in an integrated recirculated system: possible implications for aquaculture. *Aquaculture* **296**, 271–276.
- Brouwer I.A., Geelen A., Katan M.B. (2006) n-3 fatty acids, cardiac arrhythmia and fatal coronary heart disease. *Prog. Lipid Res.* **45**, 357–367.
- Calder P.C. (2014) Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **116**, 1280–1300.
- Calder P.C. (2018) Very long-chain n-3 fatty acids and human health: Fact, fiction and the future. *Proc. Nutr. Soc.* **77**, 52–72.
- Campoy C., Escolano-Margarit V., Anjos T., Szajewska H., Uauy R. (2012) Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. *Br. J. Nutr.* **107**, S85–S106.
- Castro L.F.C., Tocher D.R., Monroig Ó. (2016) Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. *Prog. Lipid Res.* **62**, 25–40.
- Coman G.J., Arnold S.J., Callahan T.R., Preston N.P. (2007) Effect of two maturation diet combinations on reproductive performance of domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture* **263**, 75–83.
- Delgado-Lista J., Perez-Martinez P., Lopez-Miranda J., Perez-Jimenez F. (2012) Long chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: A systematic review. *Br. J. Nutr.* **107**, S201–S213.
- Garrido D., Kabeya N., Hontoria F., Navarro J.C., Reis D.B., Martín M.V., Rodríguez C., Almansa E., Monroig Ó. (2019) Methyl-end desaturases with $\Delta 12$ and $\omega 3$ regioselectivities enable the de novo PUFA biosynthesis in the cephalopod *Octopus vulgaris*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1864**, 1134–1144.
- Gold D.A., O'Reilly S.S., Watson J., Degnan B.M., Degnan S.M., Krömer J.O., Summons R.E. (2017) Lipidomics of the sea sponge *Amphimedon queenslandica* and implication for biomarker geochemistry. *Geobiology* **15**, 836–843.
- Gómez S., Hurtado C.F., Orellana J. (2019) Bioremediation of organic sludge from a marine recirculating aquaculture system using the polychaete *Abarenicola pusilla* (Quatrefages, 1866) *Aquaculture* **507**, 377–384.

- Guillou H., Zadavec D., Martin P.G.P., Jacobsson A. (2010) The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog. Lipid Res.* **49**, 186-99.
- Innis S.M. (2007) Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J. Nutr.* **137**, 855-859.
- Ishikawa A., Kabeya N., Ikeya K., Kakioka R., Cech J.N., Osada N., Leal, M.C., Inoue J., Kume M., Toyoda A., Tezuka A., Nagano A.J., Yamasaki Y.Y., Suzuki Y., Kokita T., Takahashi H., Lucek K., Marques D., Takehana Y., Naruse K., Mori S., Monroig Ó., Ladd N., Schubert C.J., Matthews B., Peichel C.L., Seehausen O., Yoshizaki G., Kitano J. (2019). A key metabolic gene for recurrent freshwater colonization and radiation in fishes. *Science* **364**, 886-889.
- Jiménez-Prada P (2018) Effect of lyophilizate *Gammarus insensibilis* (Crustacea: Amphipoda) in growth, chemical composition and survival of *Seriola dumerili*. Thesis, Univ Sevilla.
- Jin M., Monroig Ó., Navarro J.C., Tocher D.R., Zhou Q. (2017) Molecular and functional characterisation of two *elovl4* elongases involved in the biosynthesis of very long-chain (>C₂₄) polyunsaturated fatty acids in black seabream *Acanthopagrus schlegelii*. *Comp. Biochem. Physiol.* **212B**, 41-50.
- Kabeya N., Fonseca M.M., Ferrier D.E.K., Navarro J.C., Bay L.K., Francis D.S., Tocher D.R., Castro L.F.C., Monroig Ó (2018) Genes for de novo biosynthesis of omega-3 polyunsaturated fatty acids are widespread in animals. *Sci. Adv.* **4**, eaar6849.
- Li M., Mai K., He G., Ai Q., Zhang W., Xu W., Wang J., Liufu Z., Zhang Y., Zhou H. (2013) Characterization of two $\Delta 5$ fatty acyl desaturases in abalone (*Haliotis discus hannai* Ino). *Aquaculture* **416-417**, 48-56.
- Li W., Feng Z., Song X., Zhu W., Hu Y. (2016) Cloning, expression and functional characterization of the polyunsaturated fatty acid elongase (ELOVL5) gene from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Gene* **593**, 217-224
- Lin Z., Hao M., Huang Y., Zou W., Rong H., Wen X. (2018) Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a fatty acyl Elov14-like elongase in mud crab, *Scylla paramamosain* (Estampador, 1949). *Comp. Biochem. Physiol.* **217B**, 70-78.
- Liu H., Zheng H., Wang S., Wang Y., Li S., Liu W., Zhang G. (2013) Cloning and functional characterization of a polyunsaturated fatty acid elongase in a marine bivalve noble scallop *Chlamys nobilis* Reeve. *Aquaculture* **416**, 146-151.
- Liu H., Zhang H., Zheng H., Wang S., Guo Z., Zhang G. (2014a) PUFA biosynthesis pathway in marine scallop *Chlamys nobilis* Reeve. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 12384-12391.
- Liu H, Guo Z, Zheng H, Wang S, Wang Y, Liu W, Zhang G (2014b) Functional characterization of a $\Delta 5$ -like fatty acyl desaturase and its expression during early embryogenesis in the noble scallop *Chlamys nobilis* Reeve. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 7437-7445.
- Liu H., Wang H., Cai S., Zhang H. (2017) A novel $\omega 3$ -desaturase in the deep sea giant tubeworm *Riftia pachyptila*. *Mar. Biotechnol.* **19**, 345-350.
- Lourenço S., Roura Á., Fernández-Reiriz M.-J., Narciso L., González Á.F. (2017) Feeding relationship between *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) early life-cycle stages and their prey in the western Iberian upwelling system: correlation of reciprocal lipid and fatty acid contents. *Front. Physiol.* **8**, 467.
- Monroig, O. 2019. Biosynthesis of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Aquatic Invertebrates: Applications in Aquaculture Nutrition. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds). Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 249-270.

- Lv F., Nie Q., Wang T., Wang A., Yang W., Liu F., Yu Y., Lv L. (2016) The effects of five dietary lipid sources on growth, body composition and antioxidant parameters of the clamworm, *Perinereis aibuhitensis*. *Aquacult. Res.* **48**, 5472-5480
- Marques B., Calado R., Lillebø A.I. (2017) New species for the biomitigation of a super- intensive marine fish farm effluent: combined use of polychaete-assisted sand filters and halophyte aquaponics. *Sci. Total Environ.* **599**, 1922–1928.
- Marques B., Lillebø A.I., Ricardo F., Nunes C., Coimbra M.A., Calado R. (2018) Adding value to ragworms (*Hediste diversicolor*) through the bioremediation of a super-intensive marine fish farm. *Aquac. Environ. Interact.* **10**, 79–88.
- Meyer A., Kirsch H., Domergue F., Abbadi A., Sperling P., Bauer J., Cirpus P., Zank T.K., Moreau H., Roscoe T.J., Zähringer U., Heinz E. (2004) Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *J. Lipid Res.* **45**, 1899–1909.
- Monroig Ó., Rotllant J., Cerda-Reverter J.M., Dick J.R., Figueras A., Tocher D.R. (2010) Expression and role of Elovl4 elongases in biosynthesis of very long-chain fatty acids during zebrafish *Danio rerio* early embryonic development. *Biochim. Biophys. Acta* **1801**, 1145–1154
- Monroig Ó., Li Y., Tocher D.R. (2011) Delta-8 desaturation activity varies among fatty acyl desaturases of teleost fish: high activity in delta-6 desaturases of marine species. *Comp. Biochem. Physiol.* **159B**, 206–213.
- Monroig Ó., Navarro J.C., Dick J.R., Alemany F., Tocher D.R. (2012a) Identification of a $\Delta 5$ -like fatty acyl desaturase from the cephalopod *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) involved in the biosynthesis of essential fatty acids. *Mar. Biotechnol.* **14**, 411–422.
- Monroig Ó., Guinot D., Hontoria F., Tocher D.R., Navarro J.C. (2012b) Biosynthesis of essential fatty acids in *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797): molecular cloning, functional characterisation and tissue distribution of a fatty acyl elongase. *Aquaculture* **360–361**:45–53.
- Monroig Ó., Tocher D.R., Navarro J.C. (2013) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: recent advances in molecular mechanisms. *Mar. Drugs* **11**, 3998–4018.
- Monroig Ó., Lopes-Marques M., Navarro J.C., Hontoria F., Ruivo R., Santos M.M, Venkatesh B., Tocher D.R. Castro L.F.C. (2016a) Evolutionary wiring of the polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway. *Scientific Reports* **6**, 20510
- Monroig Ó., Hontoria F., Varó I., Tocher D.R., Navarro J.C. (2016b) Investigating the essential fatty acids in the common cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda): molecular cloning and functional characterisation of fatty acyl desaturase and elongase. *Aquaculture* **450**, 38–47.
- Monroig Ó., de Llanos R., Varó I., Hontoria F., Tocher D.R., Puig S., Navarro J.C. (2017) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in *Octopus vulgaris*: molecular cloning and functional characterisation of a stearoyl-CoA desaturase and an elongation of very long-chain fatty acid 4 protein. *Mar. Drugs* **15**, 82.
- Moren M., Suontama J., Hemre G.I., Karlsen O., Olsen R.E., Mundheim H., Julshamn K. (2006) Element concentrations in meals from krill and amphipods, - Possible alternative protein sources in complete diets for farmed fish. *Aquaculture* **261**, 174–181.

- National Research Council (2011) Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Washington, DC: The National Academies Press.
- Navarro J.C., Villanueva R. (2000) Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: An approach to their lipid requirements. *Aquaculture* **183**, 161–177.
- Navarro J.C., Villanueva R. (2003) The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: Deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture* **219**, 613–631.
- Navarro J.C., Monroig Ó., Sykes A.V. (2014) Nutrition as a key factor for cephalopod aquaculture. In Cephalopod Culture (eds. Iglesias J., Fuentes L., Villanueva R.) Springer: Dordrecht, The Netherlands, pp. 77–96.
- Nederlof M.A.J., Jansen H.M., Dahlgren T.G., Fang J., Meier S., Strand Ø., Sveier H., Verdegem M.C.J., Smaal A.C. (2019) Application of polychaetes in (de)coupled integrated aquaculture: production of a high-quality marine resource. *Aquaculture Environment Interactions* **11**, 221–237.
- Nesto N., Simonini R., Prevedelli D., Da Ros L. (2018) Evaluation of different procedures for fertilization and larvae production in *Hediste diversicolor* (O.F. Müller, 1776) (Nereididae, Polychaeta). *Aquaculture Research* **49**, 1396–1406.
- Oboh A., Kabeya N., Carmona-Antoñanzas G., Castro L.F.C., Dick J.R., Tocher D.R., Monroig Ó. (2017) Two alternative pathways for docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n–3) biosynthesis are widespread among teleost fish. *Sci Rep.* **7**, 3889.
- Olive P.J.W. (1999) Polychaete aquaculture and polychaete science: A mutual synergism. *Hydrobiologia* **402**, 175–183.
- Olive P.J.W., Duangchinda T., Ashforth E., Craig S., Ward A., Davies S.J. (2009) Net gain of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA) in a lugworm *Arenicola marina* bioturbated mesocosm. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **387**, 223–239.
- Pairohakul S (2013) Evidence for polyunsaturated fatty acid biosynthesis in the ragworm (*Nereis virens*) and the lugworm (*Arenicola marina*). PhD dissertation. Newcastle University, Newcastle upon Tyne.
- Pajand Z.O., Soltani M., Bahmani M., Kamali A. (2017) The role of polychaete *Nereis diversicolor* in bioremediation of wastewater and its growth performance and fatty acid composition in an integrated culture system with *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research* **48**, 5271–5279.
- Pereira S.L., Leonard A.E., Mukerji P. (2003) Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **68**, 97–106.
- Pond D.W., Allen C.E., Bell M.V., Van Dover C., Fallick A.E., Dixon D.R., Sargent J.R. (2002) Origins of long-chain polyunsaturated fatty acids in the hydrothermal vent worms *Ridgea piscesae* and *Protis hydrothermica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **225**, 219 – 226.
- Quintana D., Márquez L., Arévalo J.R., Lorenzo A., Almansa E. (2015) Relationships between spawn quality and biochemical composition of eggs and hatchlings of *Octopus vulgaris* under different parental diets. *Aquaculture* **446**, 206–216.

- Ran Z., Xu J., Liao K., Li S., Chen S., Yan X. (2018) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the razor clam *Sinonovacula constricta*: Characterization of $\Delta 5$ and $\Delta 6$ fatty acid desaturases. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 4592–4601.
- Ran Z., Xu J., Liao K., Monroig Ó., Navarro J.C., Oboh A., Jin M., Zhou Q., Zhou C., Tocher D.R., Yan X. (2019) Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in the razor clam *Sinonovacula constricta*: characterization of four fatty acyl elongases and a novel desaturase capacity. *Biochim. Biophys. Acta* **1864**, 1083–1090.
- Reis D.B., Acosta N.G., Almansa E., Navarro J.C., Tocher D.R., Monroig O., Andrade J.P., Sykes A.V., Rodríguez C. (2014) In vivo metabolism of unsaturated fatty acids in *Octopus vulgaris* hatchlings determined by incubation with ^{14}C -labelled fatty acids added directly to seawater as protein complexes. *Aquaculture* **431**, 28–33.
- Ruxton C.H., Reed S.C., Simpson M.J., Millington K.J. (2007) The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Diet.* **20**, 275–285.
- Seekamp, I., 2017. Utilization of Excess Nutrients from Land-Based Aquaculture Facilities by *Hediste diversicolor* (OF Müller, 1776). Production of Polychaete Biomass and its Potential Use in Fish Feed. Master Thesis at the Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norway, pp. 96.
- Sprecher H. (2000) Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**, 219–231.
- Stubbs C.D., Anthony D.S. (1984) The modification of mammalian membrane poly- unsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* **779**, 89–137.
- Surm J.M., Prentis P.J., Pavasovic A. (2015) Comparative analysis and distribution of omega-3 lcPUFA biosynthesis genes in marine molluscs. *PLoS ONE* **10**, e0136301
- Surm J.M., Toledo T.M., Prentis P.J., Pavasovic A. (2018) Insights into the phylogenetic and molecular evolutionary histories of Fad and Elovl gene families in Actiniaria. *Ecol. Evol.* **8**, 5323–5335.
- Tacon A.G., Metian M. (2008) Global overview on the use of fishmeal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture* **285**, 146–158.
- Tocher D.R., Agaba M., Hastings N., Teale A.J. (2003) Biochemical and molecular studies of the polyunsaturated fatty acid desaturation pathway in fish. In: The big fish bang - Proceedings of the 26th annual larval fish conference (eds Browman, H. I. & Skiftesvik, A. B.) 211–227 (Institute of Marine Research, Bergen, Norway, 2003).
- Tocher D.R. (2010) Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquacult. Res.* **41**, 717–732.
- Tocher D.R. (2015) Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture* **449**, 94–107.

Acknowledgements

This research has been partly funded by the project IMPROMEGA (RTI2018-095119-B-I00), of the Ministry for Science, Innovation and Universities, Spanish Government.

This study was funded through the project IMPROMEGA of the Ministry of Science, Innovation and Universities, Spanish Government (RTI2018-095119-B-I00, MCIU/AEI/FEDER/UE) and the project BIOCYCLES of The Research Council of Norway (295063).

Nutritive Value of «Floc», Evolution of Concept Over 40y

Gaxiola, G¹., Emerenciano, M¹., Abelaez A¹, Magaña-Gallegos, E²., Aguilera, D³.,
Valenzuela M¹., Arévalo M.¹, Maldonado C¹., Cuzon, G.

¹Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal,
Facultad de Ciencias, UNAM.

²Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

³Escuela Nacional de Estudios Superiores de Mérida, UNAM

E-mail : cuzonster@gmail.com

Abstract

"Floc" becoming «BFT» (biofloc technology) can be considered as an "external rumen" for shrimp. This sets the context for completing the panorama of such unique culture medium, born in early 70s. Many studies have been conducted since then both at experimental level and at production level as well (Medina del campo). This paper summarizes the studies carried out at UNAM starting from Ecotron's latest advances during 80's. At UMDI/Sisal laboratory several thesis have been developed in the last 5 years to extend the concept to local species whose reproduction was mastered in order to examine the beneficial effects of "floc" with respect to CW (clear-water system): biochemical variations in muscle, hemomymph and hepatopancreas on grow-out shrimp then on "maturation" (secondary vitellogenesis), quality of eggs but also energy balance, respective contribution of "floc" and compound feed, then state of health for juveniles, the effect of "floc" against pathogens, the response of the immune system and Lsas (lipid soluble antioxidant system) while comparing "floc" and CW; finally the response of selected genes in these two phases of life cycle. Five species of peneids have thus been involved in these studies.

Key words : floc, peneids, evolution, physiology, stress, immune,

Introduction

-birth of "floc" 1970

History of "floc" «shrimp cultured in bacteria-based bioreactors»: Persyn (1975) worked out in microbial floc fed bacteria plus sugar, used low feed protein (20-25%), kept everything in suspension with lot of air, analyzed the cycling of nutrients from shrimp to bacteria and back again, monitored all water quality variables, and produced up to 2.7 kg/m² of 18g animals».

-resumption of the theme "floc" (Aquacop 1975)

-set up an Ecotron program (1980-88)

-transfer to private sector (Sopomer farm one world record then failed in Tahiti)

-period of stagnation

-resumption under BFT label (Avnimelech *et al.*, 1994)

-transfer in many countries of inter tropical belt

- program 2010-2019 at UNAM-UMDI Sisal w/ Emerenciano 2011, Arbelaez, 2013, Magaña, 2018, Aguilera, 2014, Valenzuela *et al.*, 2019 (5 PhD thesis,)

In the early 2000's one could read the following concept: shrimp farming has been severely criticized as an activity that harms the environment (Emerenciano *et al.*, 2011). These criticisms relate to the occupation and destruction of mangrove coastal ecosystems, the flux of altered water in estuaries, the introduction of exotic chemical species and organic pollution, the spread of diseases (Rodriguez 2001; Ostrowsky and Barbieri 2002). Although many of these impacts are difficult to assess, there are countless reports that some of these impacts can cause environment damage. However, most of the time, these problems are due to the lack of planning and management of some producers and the failure of relevant government institutions. But there are examples around the world that are well managed, shrimp farming is not always harmful for environment (Rodriguez 2001) and even positive about the socio-economic situation of development. Therefore, what is desirable for the future of shrimp activity in the world is sustainably, or provide to all economic and environment principles, without threatening the viability of natural, political and social systems, of which these services depend on (Ostrowsky and Barbieri 2002). Therefore, strategies to reduce environmental impact without losing profitability led to propose

alternatives such as reducing and replacing ingredient sources such as fishmeal (Naylor *et al.*, 2000). One of the most common practices is the transport of Pl₁₂ from hatcheries to farm, such routine being revealed as a potential vector of diseases. An example was a propagation of Wssv, mancha blanca in southern Brazil, still of unknown origin even with evidence of possible Pls introduced from other states. Culture in closed ecosystem such as BFT can limit disease vectors with a biosecurity protocol; water supply with zero or minimal renewal, recycled by settling tank or filtration back to system, greatly reducing a risk of disease in adjacent areas. A breeding bank with nursery in closed system would help fight against a spread of disease.

In addition, a nutritional potential of «floc» would impact on offspring. Knowledge on "floc" to replace fresh foods was consistent (Cahu *et al.*, 2000) but microorganisms often difficult to manage in routine increased cost associated to broodstock supply, however, quality and availability of nutrients transferred to eggs and larvae will depend on maternal diet (Palacios *et al.*, 1999). Until 1990s few data on broodstock nutrition limited eggs and larvae quality (d'Abramo and Sheen, 1994). In addition criteria to assess that unsufficiently standardized (Kjorski *et al.* 1990) limiting further development but in the last 10 years, an increased effort on nutrition made on *F. duorarum* reproduction after captured from the wild (Emerenciano *et al.*, (2012). An emphasis on feed/foods and source of breeders implied methods to classify offspring, evaluate stress impact, biochemical composition and physiological and immunological indicators.

A recent synthesis (Gaxiola *et al.*, 2017) on antecedents of "floc" with *L.vannamei* and *L.stylirostris* (Ecotron, 1980; Aquacop 1999) plus production (Sopomer....) was set for further studies To do so, the UNAM-UMDI approach and at the same time a work with *L.stylirostris* (Cardona *et al.*, 2016) plus results on nutritional value of «floc» (Magaña *et al.*, 2017) taking into account bacteria, microorganisms, pathogens and management of this complex medium, lsas system ... in this context that the research program at UNAM took place to generate a research program to shift from *L.vannamei* and *L.stylirostris* to native species of Atlantic. Biochemical aspects on juveniles were related to a change in water quality and maturation after eyestalk ablation prolonged the results (Aquacop,1979), shifting from litopenoids to other potential species. It included analysis (fatty acid, phospholipids,

cholesterol, vitamins E and C) and various other parameters on spawners and eggs (Cahu *et al.*, 2000). It showed for example the benefit of vitamins in gradual dosage for spawners. Another concern to maintain breeders whether in CW or "floc" this last medium providing the best nutrients source (particulate and/or soluble) for maturation in captivity regardless of species next to *L. vannamei* helped deepen on nutrition with respective parts of floc and compound feed (experimental then commercial) plus fresh product (mussels, squid, *Artemia* biomass ...). The research work undertaken in these different directions led to a better understanding of "floc" concept and correct application to peneids explaining reasons for better performances including survival. An index of resistance to pathogens during breeding phase sustained the approach, some enzymes identified in this phase to resist an aggression.

Finally, the environment will remain an additional constraint as it can step in with a variation of salinity, presence or absence of pathogens, not to mention an interest in microbiota to modulate damage.

Enzymes of lipid soluble antioxidant system (lsas) could step in efficiently to protect breeders. "floc" conditions very beneficial *a priori* for shrimp growth and reproduction for all species, CW could generate some stress, responses highlighted with *L. stylirostris* (Cadena *et al.* 2017). Juveniles *L. vannamei* would endure severe stress with lsas reaction. A retrospective analysis on questions raised before (Ecotron 1980) gave an occasion to refresh and deepen some concepts in UNAM lab among them immune response.

Nutritional value of floc has been the subject of many studies in recent thesis on *F. duorarum*, *F. brasiliensis* (Emerenciano 2012), *L.vannamei* (Aguilera 2017 ; Magaña 2018) or *L.setiferus* (Valenzuela 2019).

It may be find its source in a previous work on *M. japonicus* and a diet containing bacteria, such idea could come to use bacteria from the environment. In fact an initial approach came with *L. vannamei* in the 70's. Ralston Purina team's tested the concept in early 70's and caused a breakthrough, which gave dry feed a complement in terms of bacteria standing in an agitated medium that made "floc" in experimental tanks; a diet (25-20% CP) fed juveniles to grow at high stocking densities (more than 100 per m²). An Ecotron program followed to better understand and discern each nutritional contribution of various «floc» compartments (going up to 77% with a constant supply of nutrients); aside a compound feed daily supplied.

«Floc» fitted perfectly with shrimp nutritional physiology, in particular a very short transit time in a linear digestive tract. Such positive results in tanks called "moulinettes" led to design 1000m² round tanks but outdoors option brought another parameter (phytoplankton) and then competition in culture medium between bacterial «floc» and microalgae gave different scenarios: Bianchi and Bianchi (1988) studied in detail the interaction between both communities. However, the nutritional value of «floc» remained difficult to define due to such chaotic nature of the medium with succession of populations (microorganisms, algae, bacteria...), a constant resuspension provided nutritive particles without any real effort for juveniles that can filter nutrients. Many approaches attempted to quantify more or less nutrients supply.

-stable isotopes of C and N allowed to measure natural productivity in ponds with respective intake of compounded feed and particulate biomass. A large difference in $\delta^{13}\text{C}$ between feed (Glumass) and natural productivity in pond was necessary to measure respective contribution in body build-up (Cam *et al.*, 1991). Part of carbon from pellet fixed by *M.japonicus* raised in marshy area, natural productivity (a third of total) was induced by feed. This ratio is found in shrimp tissue with results for feed directly assimilated from pond. Pruteen a unicellular protein source with the lowest $\delta^{13}\text{C}$ contrast with all other ingredients and diet would differentiate clearly from natural productivity.

It was repeated in "floc" condition (constantly agitated medium) where respective proportion of feed and bacterial biomass remained difficult to assess until recently (Magaña-Gallegos *et al.*, 2018 a and b). Since then, there are two types of approaches on penaeids with juveniles or breeders. Although a compound feed alone may seem limiting, females matured by supplementation of feed with a mature "floc" (Goguenheim *et al.*, 1999; Magaña-Gallegos *et al.*, 2018a and b). It was cleared between fresh food such as mussel, squid, polychetes, ... blood worm. Definitely "fresh" or better "live mussel" initiated a maturation on non-eyestalk *M. japonicus* (Laubier-Bonichon, 1975) but most spawners under «floc» condition are now previously unilaterally eyestalk ablated (Emerenciano *et al.*, 2014; 2015). Daily intake is assessed with stable isotopes ($\delta^{15}\text{C}$) at two stages 1 and 30g of *F.brasiliensis* life cycle (Magaña-Gallegos *et al.*, 2018 a).

It has been said in the past that future breeders from "floc" condition were maturing in numbers much higher than those of animals tested in CW. Among nutrients in "floc" one will distinguish (i) the bacterial flora (autotrophic and heterotrophic) as analyzed initially (Bianchi *et al.*, 1979) permanently available in the floc medium for breeding and on the other hand (ii) copepods (the most nutritious) but also vorticelles, worms and microalgae, a dense biomass quickly assimilated by juveniles or breeders (all species combined since UNAM reported results on *L. vannamei*, *F.duorarum*, *L.setiferus* (Barral-Pintos *et al.*, 2018) in addition to previous results on *L. stylirostris* (Aquacop 1978-80). A recent report (Magaña-Gallegos *et al.*, 2018 a and b) produced a classification of various dry and/or fresh foods used in maturation and among which mussel, squid remaining superior over many other sources (troca, polychaetes, pig liver, ...) except live mussel (Laubier, 1975) and there are two examples (i) the work done on growth factor (Cruz *et al.*, 1979) and the one showing a positive effect on reproduction (Mendoza *et al.*, 1980); (ii) in the 70's a famous Nippai with its performance on weight gain (Aquacop, 1976) and reproduction as found not only on *M.japonicus* but *P.monodon*, *L.stylirostris*...

Today with the use of "floc" it is necessary to try and differentiate the respective contribution of feed/food and natural productivity in breeding environment, bringing into play stable isotopes C and N. Indeed at the end of such work, squid enhanced a contribution alongside bacterial biomass and µalgae, copepods ... One point of difficulty in interpreting such results included respective contribution from dissolved substances (amino acids, antibiotics, peptides ... organic matter), particulate fraction made of aggregates containing µalgae, worms, filamentous algae, feces colonized by bacteria, ... evolving in successive cycles (Emerenciano *et al.*, 2002; Magaña-Gallegos *et al.*, 2017) ...the nutritional bonus derived from such highly assimilable native protein, available 24h a day was a must.

Global energy intake has been evaluated in microcosm (Arbelaez, 2013) and an estimate value in order of 0.7% per day; Burford *et al.*, 2004 calculated 1-3% N from flocculated particles retained by shrimp, a relative low value available "in small currencies" during test in reproductive phase. Part of this organic matter oxidized formed black mud settled and evacuated every day. Continuous nutrient intake benefits for juvenile with short digestive tract will better match with its nutritional physiology. This is one of the characteristics of

«floc» system and a reason for performance in both primary and secondary vitellogenesis. Pellet, a compound feed also provides nutrients for shrimp and bacterial biomass through leaching and agitation of the rearing medium; thus a floc-shrimp loop works at the optimum. Ingestion of whole feed granule (collet instead of pellet) seized by pereopods V or pellet more or less crumbled may partially explain a difference in weight gain in the end.

What has been the progress of research at UNAM?

The work on «floc» was conducted on three different penaeid species (Emerenciano *et al.*, 2013) *L. stylirostris*, *L. vannamei* and *F. duorarum* to examine their ability to grow in a floc system and it gave the opportunity to verify body composition on juveniles, and with breeders to identify which one of fresh food let obtain the best performances in terms of eggs quality in lab conditions : *F. duorarum* spawning performances reared in tanks vs biofloc and *L. stylirostris* (pond reared vs. biofloc) performed during 45 and 30d after ablation ; *L. vannamei* in BFT, based on a limited water exchange, a strong aeration, with aerobic and heterotrophic microbiota.

In Arbelaez (2013) with following parameters in seawater: 26-27°C, pH 7-8, DO 4-6 mg L⁻¹, ammonia 0-0.2 mg L⁻¹, nitrite 0.01-1.0 mg L⁻¹, nitrate 0.2-2.1 mg L⁻¹ energy cost for individuals in BFT and CW considering optimal and traditional ration with *F. duorarum* FCR 2.1 and *L. vannamei* in CW (FCR 2:1) obtained with a commercial feed (15kJ g⁻¹ DE), the two species raised for 90 days in 40 tanks (60 L) and 7 shrimp/m³ in 5 replicates released : 2.6 and 2.4 kJ day⁻¹ DE *L. vannamei*⁻¹ in BFT and BFT optimal ration respectively, 3.3 and 2.4 kJ day⁻¹ DE *L. vannamei*⁻¹ in CW and optimal ration respectively ; 1.6 and 1.5 kJ day⁻¹ DE *F. duorarum* in BFT optimal, respectively and 1.2 and 1.4 kJ day⁻¹ DE *F. duorarum* in CW optimal ration respectively. It occurred a greater DE amount than in CW and 60-90% survival; commercial feed reduced economic cost-benefit analysis with a negative value in CW (\$ -455), BFT gave \$1 for *L. vannamei*. *F. duorarum* in CW and BFT: \$ 0.7 and \$ 0.7 respectively. *L. vannamei* exhibited a higher physiological status and better cost-benefit ratio than *F. duorarum*.

- particulate fractions in floc impacted wt gain and reproductive function ; stable isotopes gave a relative contribution of feed source determined with signal from $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$; fatty

acid profile of feed items acted on shrimp muscle and eggs with *L.vannamei* reared in biofloc (Magaña *et al.*, 2018).

During growout phase, isotope analysis showed biofloc particles size class $\geq 250 \mu\text{m}$ to contribute for 55-100%; fraction $\geq 50 < 250 \mu\text{m}$ for 0-22%; and feed for 0-45%. Main components analysis applied to fatty acids profile revealing the fraction $\geq 250 \mu\text{m}$ as best. Eggs controlled by isotope for relative contribution suggested polychaetes (0-100%), *Artemia* biomass (0-86%) and semi-moist feed (0-66%) as main food sources while eggs highly variable, lower contribution from squid, mussel -muscle from *L. vannamei* broodstock cultured in floc analyzed w/ stable isotopes to trace FA assimilated under "floc" conditions with dry feed, fresh/frozen food, particulate biomass allowed to segregate between sizes in abdominal muscle, two fatty acid markers identified muscle composition from fresh sources.

- 50-500 μ particles from floc impacted total fatty acids of lipid classes in *L.vannamei* abdominal muscle. (Magaña-Gallegos *et al.*, 2018 b). Females of *L. vannamei* when fed pellet or fresh food during vitellogenesis, differences emerged in percentage of total phospholipids (Lubzens *et al.*, 1995). Fresh food (20% DM) contrasted with pellets, Feed intake ingested, despite a stronger dilution, did not affect lipid content but variations indicate a benefit of "floc" and "fresh or live food" added to dry feed during maturation.

- essential (eaa) and non-essential amino acids (neaa) metabolism led to N-retention and basic ones for maturation; between protein and aa pool it probably indicated a beneficial effect on vitellogenesis II with "floc" particles and live or fresh/frozen mussel, squid and others on muscle eaa profile. In spite of frozen mussel, worms or *Artemia* it kept a good profile but squid led to loose some basic aa and same as feed, threonine was less concentrated in eaa.

- enzymes of oxidative stress (SOD, catalase, Glutation transferase) helped juveniles under adverse conditions whether in relation to pathogens in the environment, unbalanced feed , difficulties at molt, stressing agents in CW, too high stocking densities.... ; such enzymes of Lsas can contribute to get rid of free radicals and helped regenerate (together with Se) some membranes presenting defect portions (Valenzuela 2009); vitamin E from dietary origin contribute regenerate hepatopancreas (HP) and intestine tissues.

- well water vs seawater :

L.setiferus at 8ups : hemolymph is diluted and so lost ions (Mg^{+} , K^{+}) and feed input do not supply for such deficit, shrimp run short with ~20% retained energy (RE) to maintain its osmotic balance and then during trial weight gain slow down, near to collapse and mortality increased ($p<0.05$). In «floc» at 35ups it brought nutritive elements (protein, minerals, trace...) much better than at 8ups. Those comparisons allowed to explain some differences observed in zootechnia and to a lesser extent metabolic and biochemical aspects. Nitrites could bring an additional problem evidenced at 8ups more than in full seawater (SW) even though nitrifying bacteria could be in higher concentration in full SW (Barral-Pinto *et al.*, 2019). By and large, stressful rearing conditions were encountered more often in CW or in SW at various degree of dilution.

- Aguilera *et al.*, (2018 y 2019) working on *L.vannamei* in floc and its immune system evidenced a difference between *Vibrio* species in CW and biofloc, and therefore in shrimp grown in both cases a greater diversity occurred in floc, and *vibrios* classified as pathogens in CW (Arena *et al.*, 2010). *Lactobacillus* naturally present in biofloc had a mechanism similar to probiotics produced at industrial level. CW impacted growth and survival as evidenced by alterations in different tissues, leading to inferior health status compared to biofloc.

Vibrio communities were evaluated in rearing *L. vannamei* juvenile and effects on floc prevail on CW, survival rate in floc and CW recorded and probiotic tested under both conditions; in each system it increased when a probiotic was included in the diet ($p<0.05$). Daily growth rate was higher in floc than in CW ($p< 0.05$). The vibrionaceae community from HP and culture medium did not differ. Nevertheless, a novel group of *Vibrio* found in «floc» was unique; lesions observed in tissues from floc+probiotic treatment reached a low level; it suggests that probiotic contributed to homeostasis and prevented outbreak of opportunistic pathogenic species.

The effectiveness of the immune defense of *L. vannamei* previously reared in biofloc or in a traditional clear seawater (CW) rearing system was addressed after a bacterial challenge with a pathogenic strain of *V. harveyi*. Changes caused from previous rearing system and challenge assessed on glucose, cholesterol, acylglycerides, protein, hemocyanin, Lsas (SOD and CAT), and gene expression related to immune response (SOD, $\alpha 2$ macroglobulin, ProPo, hemocyanin, and penaeidin-3a). Biofloc was associated with an increase in protein, SOD, $\alpha 2$

macroglobulin, and ProPo genes ($p < 0.05$). Juveniles previously reared in biofloc had a positive interaction in presence of *V. harveyi* affected its hemocyanin concentration ($p < 0.05$), an interaction between the two rearing systems and shrimp challenged with bacteria produced more transcription of hemocyanin gene. Likewise, biofloc and CW maintained a higher transcription of ProPo gene after a bacterial challenge. In absence of bacteria, shrimp from biofloc group produced a higher transcription of penaeidin-3a gene. *V. harveyi* caused HP lesions and mortalities only in shrimp previously reared in CW. These results suggest that «floc» help prevent a development of disease by improving immune response. In *L. vannamei* previously reared in biofloc then challenged with different densities of *Vibrio harveyi* (10^3 - 10^8 CFU per ml) got some signs of disease and mortality led to a possible modification of immune-related genes (hemocyanin, $\alpha 2$ -macroglobulin, Pro-Po and penaeidin) that would exist at a transcriptional level. Gene expression was up- or downregulated based on bacteria density, indicating that defence mechanisms were activated to remove pathogen; genes analysed were not affected in control group (without bacteria) or at 10^3 CFU per ml group. Pro-Po gene expressed at 10^4 CFU per ml group, whereas transcripts of $\alpha 2$ -macroglobulin gene were detected at 10^5 and 10^6 CFU per ml. Penaeidin and hemocyanin genes were upregulated at 10^7 and 10^8 CFU per ml in groups which signs of disease and mortality were evidenced. These results suggest that genes involved in shrimp immune response fluctuate according to pathogen density, and when this density increased, tolerance and defence mechanisms are inefficient. For this reason, disease and mortality were observed in shrimp regardless of previous condition in biofloc (Aguilera *et al.*, 2018, Rivera *et al.*, 2009).

In summary, UNAM contribution in the field of super intensive culture in "floc" with penaeids led to:

- diversify the species (*F. duorarum* and *F. brasiliensis*) likely to benefit from a particulate biomass in "floc" (Emerenciano *et al.*, 2012; 2013; Arbelaez 2013) initially focusing on some energy aspects of "floc".
- improve knowledge of the respective contribution of floc and compounded feed for juveniles and breeders (Magaña-Gallegos *et al.*, 2018)

-failed to improve performances of males *F.duorarum* in CW or in "floc", fed with or without fresh food. Spermatophores formation, spiked sperm, spermatozoids motility were not modified with the rearing conditions or feeding regime (Arevalo *et al.*, 2013).

- consider the benefits of "floc" on the immunity of shrimp from several species (Aguilera *et al.*, 2018) and examine the incidence of pathogenic *Vibrios*.

- Valenzuela *et al.*, (2019) addressed the lipid soluble antioxidant system in two species

-some genetic aspects to compare the respective benefits of «floc» and CW, once juveniles cultured at full salinity (35ups) compared to diluted seawater (8ups) in order to extend the properties of «floc» to other potential environment spots dedicated to farming in the region.

«Floc» will remain a chaotic medium, as indicated for copepods (May 1974) and in the majority of cases producers fall currently in a model with a balance between phytoplankton and "floc". But this environment when it is well conducted provides an exceptional nutritional contribution on one hand by its particles, aggregates of organic matter, islets carrying micro-organisms and microalgae. And this almost permanently what suits the feeding mode of shrimp juveniles. A benefit of a presence of native proteins, fatty acids, carbohydrates, vitamins.... and other growth factor, amino acids,.... was there. Moreover by reducing oxidative stress it allowed a healthy situation on top of food/feed supply, tests showing a better resistance to an experimental infection (Aguilera *et al.*, 2017) and active molecules (antibiotics, prebiotics...) which are found in floc under certain conditions could prevent some risk of infection. Magaña's work released ample details with the stable isotopes method and benefits in terms of resistance to experimental infections of floc-born animals compared to those juveniles in CW derived from Aguilera *et al.*, (2017-18). The fundamental contribution on «floc» was on diet with a least pressure put on formulation of a compounded feed which in combination with bacteria and phytoplankton allowed at this stage a bloom of organisms, copepods,to place shrimp to express their maximum growth potential and high survival rate. Weight gain at moult proved to be substantial despite a high stocking density. Lastly, mention should be made of the work done at UNAM (Magaña *et al.*, 2018) to approach shrimp maturation in captivity and a comparison of females from floc or CW ; it characterized a nutritional benefit of «floc» thanks to a so-called tri-phasic diet made not only of dry compounded diet, but particulate biomass not to mention "dissolved organic

matter" . Finally, work originally done with *P.vannamei* then *P.stylirostris* extended to *L.setiferus*, *F.duorarum*, *F.brasiliensis*.... will give place for a sustainable activity.

Large production areas in open air brings at the same time bacterial «floc» and phytoplankton, but sometimes a balance is difficult to manage, it is for this reason that initiatives of farming in quasi dark condition was attempted to go back to fundamentals of «floc» namely a quality bacterial medium indoors at dark, pure bacterial «floc»+feed (gambasnatural). Have we gone around the question? it is difficult to answer in affirmative as parameters are numerous, and in practice one system function not identical to another (water quality, set of particulate biomass, carbon source or not, daily water exchange, shrimp feed, feed changes : pellets/collets, green pellet ...), ration table, pond with liner or soil, phytoplankton +/- developed, O₂ variations, molting ... «floc» playing as someone said as an «external rumen».

References

- Aguilera-Rivera, D Prieto-Davó, A Gaxiola, G. 2014. Probiotic effect of floc on *Vibrios* in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. aquaculture DOI:10.1016/j.01.008
- Aguilera D., Escalante, K., Gaxiola, G., Prieto, A. 2018. Immune response of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, previously reared in biofloc and after an infection assay with *Vibrio harveyi* Journal of the World Aquaculture Society DOI: 10.1111/jwas.12543
- Aquacop, 1979. Penaeid reared broodstock: closing the cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. Proc. World Mariculture. Soc. 10, 445 - 452.
- Arbelaez, A. 2013. Comparación del rendimiento fisiológico y bioeconómico entre dos especies de camarón (*Litopenaeus vannamei* y *Farfantepenaeus duorarum*) en el sistema de engorda tradicional y biofloc technology (BFT). Tesis de maestría, Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM. 19-06-2013.
- Arcos, F.G., Racotta, I.S., Palacios, E., Ibarra, A.M., 2005. Ovary development at the onset of gametogenesis in shrimp *Litopenaeus (Penaeus) vannamei* is genetically determined and correlated with reproductive traits at maturity. Marine Biology 148, 339-346.
- Arcos, F.G., Palacios, E., Ibarra, A.M., Racotta, I.S., 2005. Larval quality in relation to consecutive spawnings in white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. Aquaculture Research 36, 890-897.
- Arena, L. Aviléz, E., Rojas, R., Perez-Rueda, E., Apodaca, J., Cuzon, G. Gaxiola G. 2010. Study of genetic diversity and bacterial flora composition in *Litopenaeus vannamei* raised in “floc”. Biofloc Sessions at WAS San Diego 2010.
- Arevalo, M., Wasilesky W., Noreña E., Emerenciano M., Cuzon, G and Gaxiola, G. 2013. Failure to improve performances of males *Farfantepenaeus duorarum* in “floc”.
- Aviléz, E., Rojas, R., Perez-Rueda, E., Apodaca, J., Cuzon, G. Gaxiola G and Arena L. 2018. Study of genetic diversity and bacterial flora composition in *Litopenaeus vannamei* raised in “floc”. int. report.
- Avnimelech, Y., Kochva, M., Diab, S. 1994. Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted carbon to nitrogen ratio. Bamidgeh 46:119-13.
- Barral-Pintos *et al.* 2019. Nutritional performances of *Litopenaeus setiferus* fed diet or feed in a zero water exchange at two salinities. *In press*.
- Bianchi M. A., Lelong P. P., Martin Y. P., 1979. Dynamique des populations planctoniques et bactériennes au cours d'une production expérimentale de phytoplancton marin naturel. 1. But de l'étude, variations quantitatives, Vie Mar., 1, 1-6.
- Burford, MA., Thompson, PJ. McIntosh RP., Bauman, RH. Pearson DC. 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero exchange system Aquaculture 232, 1-4, 525-537. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00541-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00541-6)
- Cahu, C. 1998. Diets for shrimp broodstock and their effect on larval quality. IV Symposium Intl nutricion acuicola. La Paz, Mexico

Gaxiola, G., Emerenciano, M., Abelaez A., Magaña-Gallegos, E., Aguilera, D., Valenzuela M., Arévalo M., Maldonado C., Cuzon, G. 2019. Nutritive Value of «Floc», Evolution of Concept Over 40y. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 271-286.

- Cam, D. 1987. Détermination des contributions relatives de la productivité naturelle et de l'aliment à la ration alimentaire de la crevette *Penaeus japonicus* élevée en conditions semi-intensives. 2^{ème} Campagne Station Expérimentale Aqualive (internal report).
- Cam, D., Rollet, P-E, Mariotti, A, Guillaume, J. 1991. The relative contribution of natural productivity and formulated food in the nutrition of *Penaeus japonicus* reared in semi-intensive conditions Aquat. Living Resour. 4, 75-180.
- Cardona, E. 2015. Influence de l'environnement trophique de l'élevage en biofloc sur les performances physiologiques de la crevette *Litopenaeus stylirostris*: étude de paramètres de la nutrition, de l'immunité et reproduction PhD UoNC <https://archimer.ifremer.fr/doc/00272/38294/>
- Cardona, E., Gueguen, Y., Saulnier D. 2016. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. BMC Microbiology
- Chan-Vivas, E., Magaña-Gallegos, E., Maldonado, C., Escalante, K., Gaxiola, G., Cuzon, G.Y. 2018. Does biofloc improve the energy distribution and final muscle quality of shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1883)? Journal of the World Aquaculture Society DOI:10.1111/jwas.12522.-D'Abramo, L.R., 1997. Triacylglycerol and fatty acids. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), Crustacean Nutrition: World Aquaculture Society, 6. Baton Rouge, LA, pp. 71-84.
- Ecotron, 1980. Optimisation des méthodes d'élevage des crevettes penaeides en technique intensive suraérée. Compte rendu DGRST, 20pp.
- Emerenciano, M., Ballester, E.L.C., Cavalli, R.O. and Wasielesky, W. 2011. Effect of BFT on the early postlarval stage of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: growth performance, floc composition and salinity stress tolerance. Aquaculture International 19:891-901.
- Emerenciano, M., Cuzon, G. Mascaró, M. Arévalo, M. Noreña-Barroso, E., Jerónimo, G. Racotta, IS. Gaxiola, G. 2012. Reproductive performance, biochemical composition and fatty acid profile of wild-caught 2nd generation domesticated *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939) broodstock Aquaculture 344-349, 194-2043 <http://dx.doi.org/10.1016>.
- Emerenciano, MGC., Cuzon, GY., Goguenheim, J. Gaxiola, G. 2012. Floc contribution on spawning performance of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* Aquaculture Research 44 (1) DOI: 10.1111/j.1365-2109.2011.03012.x
- Emerenciano, MGC., Cuzon, G., Miguel Arévalo, Miquelajáuregui, MM., Gaxiola G. 2012 . Effect of short-term fresh food supplementation on reproductive performance, biochemical composition, and fatty acid profile of *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared under biofloc conditions Aquaculture 344-349, 194-204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.014>
- Emerenciano M., Cuzon G. and Gaxiola, G. 2012. BFT perspectivas para la Península de Yucatán. In: Recursos Costeros del Sureste: tendencias actuales en investigación y estado del arte (ed. A.J. Sanchez, R. Brito-Pérez & Chiappa-Carrara) UNAM and Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Yucatán, Merida, Mexico.

- Emerenciano, M., Ballester, ELC., Cavalli, R.O. and Wasielesky W. 2012. BFT application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture Research* 43:447-457.
- Emerenciano, M., Cuzon, G. Paredes A. and Gaxiola G. 2013. Evaluation of biofloc technology in pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* culture: growth performance, water quality, micro-organisms profile and proximate analysis of biofloc. *Aquaculture International* 21:1381-1394.
- Gaxiola, G. and Cuzon, G. 2015. "floc" story. *Eds: Cruz Suárez, L.E. Ricque Marie, D. Tapia Salazar, M. Nieto López, M.G. Villarreal-Cavazos, D.A., Gamboa Delgado, J. y Rivas Vega M.E. Nutrición Acuícola: investigación y desarrollo*, UANL, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. ISBN: 978-607-27-0593-7.
- Goguenheim J., Rouxel C., Blanvillain C., De Gregorio C. & Aquacop 1999. Use of refrigerated sperm of *Penaeus stylirostris*: insemination and fertilization results. In: *Book of Abstracts of International Congress of Cryobiology*, 12-15 july, 256pp. Marseille, France.
- Ibarra, A., Ramírez, J.L., Racotta, I.S., Palacios, E., Magallon, F., 1997. Performance comparison of eggs and nauplii for spawners from a 2nd generation domesticated and wild shrimp *Penaeus vannamei*. In: *Alston, D.E., Green, B.W., Clifford, H.C. Eds., IV Symp. Aquaculture Central America*, 22-24 04, Tegucigalpa, Honduras, WAS-ANDAH pp.159-160.
- Kuhn DD, GD. Boardman, AL Lawrence, L Marsh, GJ Flick. 2009. Microbial floc generated in bioreactors is a superior replacement ingredient for fish meal or soybean meal in shrimp feed. *Aquaculture* 296: 51-57.
- Lubzens E., Zmora, O., Barr, Y. 2001 Biotechnology and aquaculture of rotifers *Hydrobiologia* 446-447(1):337-353 doi: 10.1023/A:1017563125103.
- Magaña-Gallegos, E., Bautista-Bautista, M., González-Zuñiga Magaña-Gallegos, E., Bautista-Bautista, M., González-Zuñiga, L M., Gaxiola, G. 2018. Does unilateral eyestalk ablation affect the quality of the larvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Decapoda:Dendrobranchiata:Penaeidae)? *Journal of Crustacean Biology* 38(4). DOI: 10.1093/jcbiol/ruy043
- Magaña-Gallegos, E. *et al.* 2018. Nutritional contribution of biofloc within the diet of growout and broodstock of *L.vannamei* determined by stable isotopes and fatty acids: biofloc contribution in feeding *L.vannamei*. *JWAS* 49(5). DOI: 10.1111/jwas.12513
- May, R.M. 1974. Biological populations with nonoverlapping generations: stable points, stable cycles, and chaos. *Science* 186, 645-647.
- Pascual, C., Sánchez, A., Zenteno, E., Cuzon, G., Gabriela, G., Brito, R., Rosas, C. 2006. biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 251, 416-429.

- Palacios, E., Perez-Rostro, C.I., Ramirez, J.L., Ibarra, A.M., Racotta, I.S., 1999. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. *Aquaculture* 171, 309–321.
- Palacios, E., Ibarra, A.M., Racotta, I.S., 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture* 185, 353–371.
- Persyn, H.O. 1975. pers. com.
- Racotta, I.S., Palacios, E., Hernández-Herrera, R., Bonilla, A., Ramirez, J.L., 2004. Criteria for assessing larval and postlarval quality in white pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). *Aquaculture* 233, 181-195.
- Rodríguez-Fuentes, G., Escalante-Herrera KS., Guerra-Castro, E., Gaxiola G. 2019. Differential expression of immune-related genes in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, previously reared in biofloc and challenged with *Vibrio harveyi*. *Aqua. Res.* 50,8, 2039-2046.
- Rollet, P.E. 1986. Détermination des contributions relatives de la productivité naturelle et de l'aliment granulé à la ration alimentaire de la crevette *Penaeus japonicus* élevée en conditions semi-intensives. Rapport Ifremer, station Aqualive, Noirmoutier, 79p.
- Rosas, C., Cooper, E.L., Pascual, C., Brito, R., Gelabert, R., Moreno, T., Sánchez, A., 2007. Physiological and immunological conditions of the wild populations of *Farfantepenaeus duorarum* from the Campeche Sound (Crustacea:Penaeidae). *Marine Biology* 152, 929-938.
- Sohier, LP. and Bianchi, MA. 1985. Development of a heterotrophic bacterial community within a closed prawn aquaculture system. *Microb. Ecol.* 11(4):353-69. doi:10.1007/BF02016817.
- Sopomer shrimp farm in floc system to produce *L.stylirostris* in Tahiti 1991-2004 (internal report).
- Valenzuela-Jiménez, M. Durruty-Lagunes, C., Rodríguez-Fuentes, G., Monserrat, J., Cardoso-Parra, K., Cuzon, G., Hernández.López, I., Wasielesky Jr. W. and Gaxiola-Cortés, G. 2019. Antioxydant response of *Litopenaeus setiferus* wild juveniles from Mexico gulf in two lab conditions. *in press*.

Acoustics as a Tool to Monitor Shrimp Feeding Activity

Silvio Peixoto^{1,2}, Roberta Soares^{1,2}, Jose Filipe da Silva¹, Santiago Hamilton¹, Joao Reis²,
Melanie Rhodes², Allen Davis²

¹ Federal Rural University of Pernambuco - Dep. Fisheries and Aquaculture, 52171-900,
Recife, PE, Brazil.

² Auburn University - School of Fisheries, Aquaculture and Aquatic Sciences, Auburn, AL
36849, USA

Corresponding author: silvio.peixoto@gmail.com

Abstract

Passive acoustics monitoring (PAM) is a useful tool to provide information on the behavior of several aquatic species, including crustaceans. The sounds produced by shrimps were described as “clicks” associated with feeding activity. The emission of these clicks occurs when mandibles close, as they have calcifications to shred the food. The main acoustic parameters analyzed during shrimp feeding activity are the number of clicks, frequency band and energy of the sound. Analysis of these parameters is an exceptional tool for evaluating feeding activity, feed intake and preferences of the shrimp. Furthermore, these parameters can be used to monitor the feeding activity during the culture cycle. Consequently, automated feeding has been developed according to the specific acoustic signals for different species, culture phases and management strategies. This review will cover our latest studies on the acoustics of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in controlled laboratory conditions and pond farming to improve feeding management.

Keywords: bioacoustics; penaeid; feeding management.

Introduction

Passive acoustics monitoring (PAM) has become an increasingly popular tool to study the interaction of sounds in the environment and provide information on the behavior of different aquatic species, including crustaceans (Locascio & Mann 2008; Lammers & Munger 2016). Several crustaceans can produce sounds using different emission mechanisms, which are usually associated with specific activities, such as reproduction, territorialism and feeding (Boon, Yeo & Todd 2009; Bohnenstiehl, Lillis & Eggleston 2016; Coquereau, Grall, Chauvaud, Gervaise, Clavier, Jolivet & Di Iorio 2016).

The sounds produced by shrimps were described as “clicks” associated with feeding activity. The emission of these clicks occurs when mandibles close, as they have calcifications to shred the food (Smith & Tabrett 2013; Silva, Hamilton, Rocha, Borie, Travassos, Soares & Peixoto 2019). Analysis of these acoustic signals is an exceptional tool for evaluating feeding activity, feed intake and preferences of the shrimp. Consequently, automated feeding systems have been developed according to the specific acoustic signals for different species, culture phases and management strategies. These systems have been successfully improving feeding management in shrimp farming (Napaumpaiporn, Chuchird & Taparhudee 2013; Jescovitch, Ullman, Rhodes & Davis 2018; Ullman, Rhodes, Cline, Hanson & Davis 2019; Ullman, Rhodes & Davis 2019; Reis, Swanepoel, Novriadi, Rhodes & Davis 2019).

Mechanisms of sound production in Crustaceans

Crustaceans can emit sounds using different mechanisms and associated with specific situations, such as the well-known territorialistic behavior sound of snapping shrimps (*Alpheus* and *Synalpheus*) by closing their chela (Lillis, Perelman, Panyi & Mooney 2017). Lobsters of the genus *Homarus* emit a buzzing sound vibrating their shells by contracting specific muscles when they are threatened (Jézéquel, Bonnel, Coston-Guarini, Guarini & Chauvaud 2018). However, under similar circumstances the lobsters of the Palinuridae family produced a rasp sound by the stridulatory system located in the antenna base (Patek 2002; Hamilton, Silva, Pereira-Neves, Travassos & Peixoto *in press*). In this case, a friction

mechanism called 'stick-and-slip' operates similarly to a bow and the strings of a musical instrument (Patek 2001).

Although crustaceans intentionally produce sound due to sexual, territorial and social behaviors (Popper, Salmon & Horch 2001), other activities emit involuntary sounds, such as movement on the substrate, swimming and feeding (Coquereau *et al.* 2016; Silva *et al.* 2019). This is the case of the sounds produced by shrimps, which are key elements of the acoustic landscape in coastal habitats (Radford, Jeffs, Tindle & Montgomery 2008; Lillis, Eggleston & Bohnenstiehl 2014). The sound pattern, called “clicks”, produced by *Litopenaeus setiferus* in fishing areas of the Gulf of Mexico was associated with their feeding activity (Berk, Evans, Benson & Duncan, 1996). These clicks are emitted when the mandibles collide and scrape against one another as they have calcifications to shred the food (Smith and Tabrett 2013; Silva *et al.* 2019).

The mandibles were also identified as the morphological structures responsible for the emission of the sound in *Penaeus monodon* (Smith & Tabrett 2013) and *Litopenaeus vannamei* (Silva *et al.* 2019) by analyzing synchronized audio and video during the feeding activity (Figure 1).

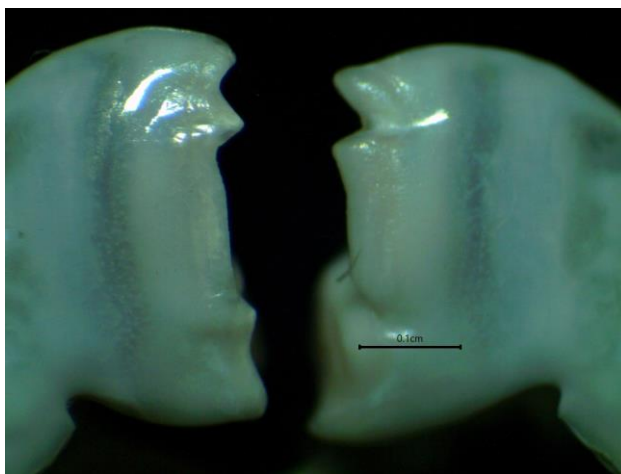


Figure 1. Stereoscopic microscope image of a pair of mandibles of *Litopenaeus vannamei*

Passive acoustics applied in shrimp culture

Passive acoustics could be applied not only in fisheries research to estimate the occurrence and distribution of shrimp populations (Berk *et al.* 1996), but also in aquaculture to provide information about their feeding activity in laboratory conditions and pond farming (Smith & Tabrett 2013; Ulman *et al.* 2019 a; Ulman *et al.* 2019 b; Reis *et al.* 2019; Silva *et al.* 2019). The main acoustic parameters analyzed during shrimp feeding activity are the number of clicks, frequency band and energy of the sound (Berk *et al.* 1996; Smith & Tabrett 2013; Silva *et al.* 2019). However, it is necessary to improve our knowledge regarding the characteristic acoustic variables in the feeding activity for different species, culture phases and management strategies.

The number of clicks per pellet of *L. vannamei* ranged from 121 and 154, with no significant differences among the size classes between 13 to 35g (Silva *et al.* 2019). Apparently, the number of clicks per pellet observed for *L. vannamei* is much higher than only 2.2 clicks per pellet reported for *P. monodon* by Smith & Tabrett (2013). Although there is no information about the weight of *P. monodon* in this study, the total length reached by *P. monodon* is larger than that of *L. vannamei* (Perez-Farfante & Kensley 1997), which may explain the differences in number of clicks emitted by these species.

Although the total number of clicks per pellet did not differ among size classes of *L. vannamei*, in large shrimp (35g) most of the clicks were during the first minute after the capture of the pellets when compared to smaller size classes (13 to 22g) that showed a steady clicking rate during 10 minutes of recording (Silva *et al.* 2019). The authors suggested that this is probably associated with their larger stomach volume and greater voracity to consume food quickly. The amount of food ingested by penaeids is proportional to its biomass (Jory, Cabrera, Dugger, Fegan, Lee, Lawrence, Jackson, McIntosh & Castañeda, 2001; Soares, Wasielesky, Peixoto & D’Incao 2005), and the volume of the anterior portion of the stomach is directly related to their size (Wassenberg & Hill 1987).

The main acoustic parameters of an isolated click of *L. vannamei* are indicated in the figure 2. The mean values of the acoustic parameters recorded during feeding activity of *L. vannamei* (13 to 35g) were a lower frequency of 3.47 kHz, higher frequency of 37.75 kHz, frequency peak of 11.1 kHz, maximum energy of 83.55 dB and sound duration of the isolated clicks of 4.7 ms (Silva *et al.* 2019). The lower frequency and maximum energy of the clicks emitted by *L. vannamei* were similar to those reported by Berk *et al.* (1996) for *L. setiferus* (2 kHz and 112 dB, respectively). However, the higher frequency (8 kHz), frequency peak (4.7 kHz) and sound duration of *L. setiferus* were lower than those observed for *L. vannamei* by Silva *et al.* (2019). These acoustic variables may be influenced not only by physical factors of the recording environment in which the shrimps were kept (e.g. shape and material of the tanks, water volume and location of the hydrophone), but also by the commercial diet offered (e.g. formulation, size and hardness of the pellets) and characteristics of the animals (e.g. species, size, molt cycle, stress level and fasting period).

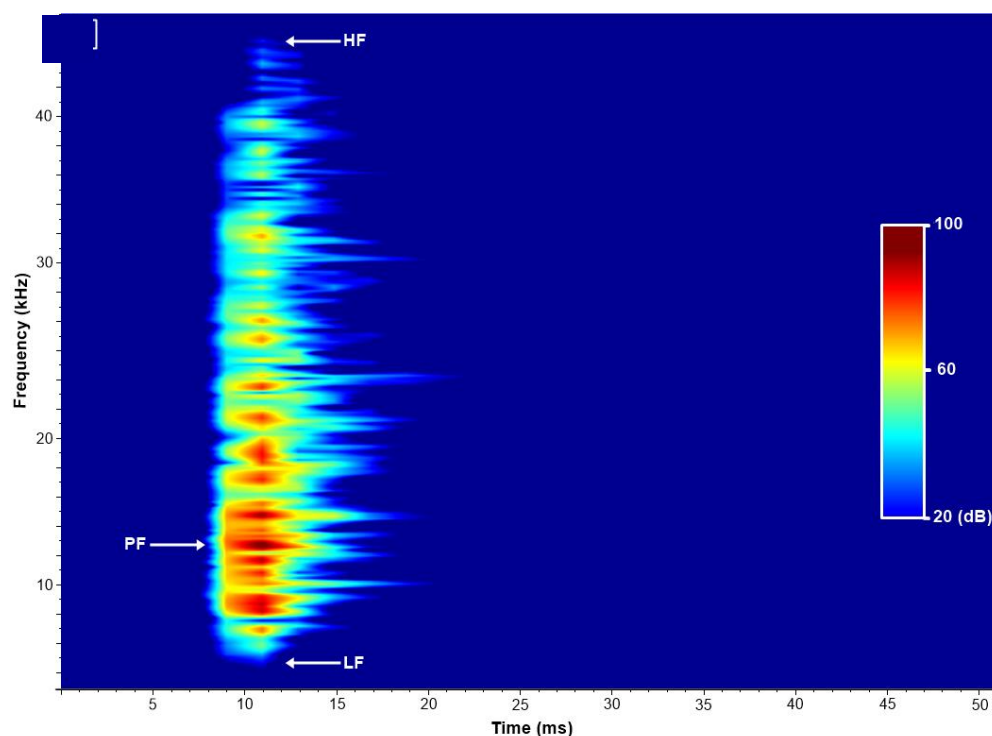


Figure 2. Spectrogram of frequency (kHz) with a color bar indicating maximum energy in decibels (dB) of an isolated “click” during the feeding activity of *Litopenaeus vannamei* (adapted from Silva *et al.* 2019). Arrows indicate the low (LF), high (HF) and peak frequency (PF).

The sound signatures of successive clicks generated by *P. monodon* were related to its feeding in ponds less than a decade ago, enabling the estimation of food intake during the culture cycle (Smith & Tabrett 2013). The sound of shrimp feeding activity (clicks) can be detected by hydrophones even with the loud background noise produced by aerators (Figure 3). Consequently, automated equipment to spread out the feeding and feed according to activity has been developed and successfully improved feeding management in shrimp farming (Napaumpaiporn *et al.* 2013; Jescovitch *et al.* 2018; Ulman *et al.* 2019 a; Ulman *et al.* 2019 b; Reis *et al.* 2019). This new technology is an alternative to replace standard feeding trays, which is probably the most common feed management technique to improve growth and yield in shrimp farming (Casillas-Hernandez, Nolasco-Soria, Garcia-Galano, Carrillo-Farnes & Paez-Osuna 2007). However, the use of feeding trays may outweigh the production benefits due to intensive labor requirements to manually monitor the feed consumption (Jory 2016; Ullman *et al.* 2019 b).

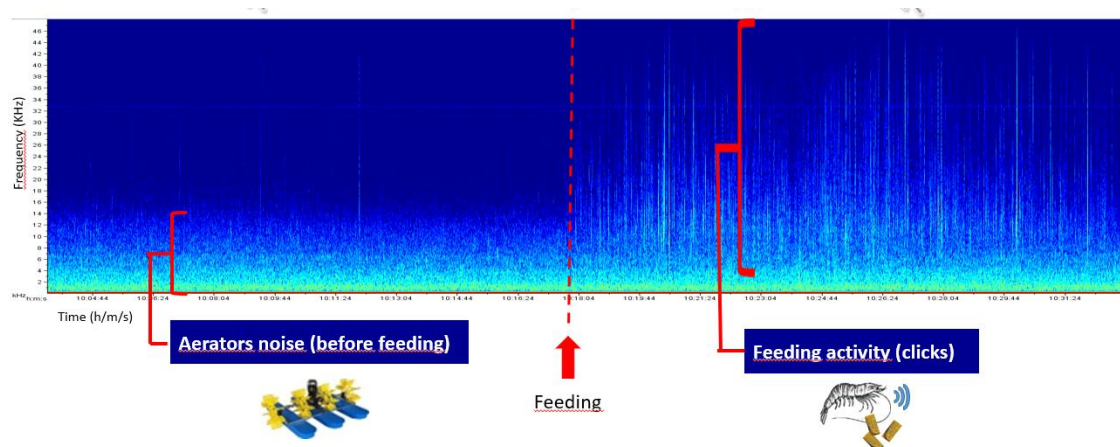


Figure 3. Spectrogram of frequency (kHz) showing the soundscape before (only aerators noise) and after feeding (aerators and clicking noises) in *Litopenaeus vannamei* pond culture.

Previous research using acoustic demand-feeding system (AQ1 Systems, Tasmania, Australia) have shown the potential for significant improvements to *L. vannamei* growth and yield in comparison to two hand feeding per day or timer based feeding 6 times per day

(Jescovitch *et al.* 2018; Ullman *et al.* 2019 a; Ullman *et al.* 2019 b). The final weight of *L. vannamei* using the AQ1 system was up to 38% and 23% larger than hand and timer-feeding, respectively, over a 16-week production period (Ullman *et al.* 2019 a; Ullman *et al.* 2019 b). Additionally, economical analysis showed a higher net benefit of the AQ1 (\$2,216/ha) in comparison to the timer feeding system (\$10,153/ha) when stocked at 17 shrimp/m² (Ullman *et al.* 2019 a). Although the automated feedback system has a high initial investment, the increased returns can pay off those investments in one production cycle (Ullman *et al.* 2019 a).

Conclusion

Passive acoustic monitoring (PAM) has significant potential for evaluating feeding activity, feed intake and preferences of the shrimp. Results of automated system based on acoustics have demonstrated significant improvements in feed conversion, growth performance, yield and value of *L. vannamei* produced in semi-intensive pond culture. Further studies are needed to improve our knowledge regarding the characteristic acoustic variables in the feeding activity for different species, culture phases and management strategies.

References

- Berk I.M., Evans W.E., Benson R.H., Duncan, M.E. (1996). The use of passive sonar to detect sound production and calculate population densities of penaeid shrimp in the Gulf of Mexico. *Journal of the Acoustical Society of America* **99**, 2533-2574.
- Bohnenstiehl D.R., Lillis A., Eggleston D.B. (2016) The curious acoustic behavior of estuarine snapping shrimp: temporal patterns of snapping shrimp sound in sub-tidal oyster reef habitat. *PLoS One*. **11**, e0143691.
- Boon P.Y., Yeo D.C.J., Todd P.A. (2009) Sound production and reception in mangrove crabs *Perisesarma* spp. (Brachyura: Sesarmidae). *Aquatic Biology* **5**, 107-116.
- Casillas-Hernandez R., Nolasco-Soria H., Garcia-Galano T., Carrillo-Farnes O., Paez-Osuna F. (2007) Water quality, chemical fluxes and production in semi-intensive Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* culture ponds utilizing two different feeding strategies. *Aquaculture Engineering* **36**, 105-114.
- Coquereau L., Grall J., Chauvaud L., Gervaise C., Clavier J., Jolivet A., Di Iorio L. (2016) Sound production and associated behaviours of benthic invertebrates from a coastal habitat in the north-east Atlantic. *Marine Biology* **163**, 127.
- Hamilton S., Silva J.F., Pereira-Neves A., Travassos P., Peixoto S. (in press) Sound production mechanism in the Brazilian spiny lobsters (Family Palinuridae). *Zoomorphology*
- Jescovitch L.N., Ullman C., Rhodes M., Davis D.A. (2018) Effects of different feed management treatments on water quality for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research* **49**, 526-531.
- Jézéquel Y, Bonnel J, Coston-Guarini J, Guarini JM, Chauvaud L (2018) Sound characterization of the European lobster *Homarus gammarus* in tanks. *Aquatic Biology* **27**, 13-23.
- Jory D. (2016) The proper management of commercial shrimp feeds, part 2, Global Aquaculture Advocate, pp. <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/the-proper-management-of-commercial-shrimp-feeds-part-2/>.
- Jory D.E., Cabrera T.R., Dugger D.M., Fegan D., Lee, P.G., Lawrence A.L., Jackson C.J., McIntosh R.P., Castañeda J. (2001) A global review of shrimp feed management: status and perspectives. In: Browdy CL, Jory DE (eds) The new wave: proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, pp. 104–152. The World Aquaculture Society, Baton Rouge,
- Lammers M.O., Munger L.M. (2016) From Shrimp to Whales: Biological Applications of Passive Acoustic Monitoring on a Remote Pacific Coral Reef. In: Au W, Lammers M (eds) Listening in the Ocean. Modern Acoustics and Signal Processing. Springer, pp. 61-81. New York.
- Lillis A., Eggleston D.B., Bohnenstiehl D.R. (2014) Estuarine soundscapes: distinct acoustic characteristics of oyster reefs compared to soft-bottom habitats. *Marine Ecology Progress Series* **505**, 1-17.
- Lillis A, Perelman JN, Panyi A, Mooney TA (2017) Sound production patterns of big-clawed snapping shrimp (*Alpheus* spp.) are influenced by time-of-day and social context. *Journal of the Acoustical Society of America* **142**, 3311-3320.

- Locascio J.V., Mann D.A. (2008) Diel periodicity of fish sound production in Charlotte Harbor, Florida. *Transactions of the American Fisheries Society* **137**, 606-615.
- Napaumpaiporn T., Chuchird N., Taparhudee W. (2013) Study on the efficiency of three different feeding techniques in the culture of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin* **37**, 8–16.
- Patek S.N. (2001) Spiny lobsters stick and slip to make sound. *Nature* **411**, 153–154.
- Patek S.N. (2002) Squeaking with a sliding joint: mechanics and motor control of sound production in palinurid lobsters. *Journal of Experimental Biology* **205**, 2375–2385.
- Perez-Farfante I., Kensley B. (1997) Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Editions du Muséum National d'Histoire Naturelle* **175**, 1-233.
- Popper AN, Salmon M, Horch KW (2001) Acoustic detection and communication by decapod crustaceans. *Journal of Comparative Physiology A* **187**, 83-89.
- Radford C.A., Jeffs A.G., Tindle C.T., Montgomery J.C. (2008) Temporal patterns in ambient noise of biological origin from a shallow water temperate reef. *Oecologia* **156**, 921-929.
- Reis R.T., Swanepoel A., Novriadi R., Rhodes M., Davis A. (2019) Testing soy-optimized feeds and automated feeding systems in shrimp pond production. *Global Aquaculture Advocate* www.aquaculturealliance.org/advocate/testing-soy-optimized-feeds-automated-feeding-systems-shrimp-pond-production/?headlessPrint=AA
- Silva J.F., Hamilton S., Rocha J.V., Borie A., Travassos P., Soares R., Peixoto S. (2019) Acoustic characterization of feeding activity of *Litopenaeus vannamei* in captivity. *Aquaculture* **501**, 76-81.
- Smith D.V., Tabrett S. (2013) The use of passive acoustics to measure feed consumption by *Penaeus monodon* (giant tiger prawn) in cultured systems. *Aquacultural Engineering* **57**, 38-47.
- Soares R., Wasielesky W, Peixoto S., D'Incao F. (2005) Food consumption and gastric emptying of *Farfantepenaeus paulensis*. *Aquaculture* **250**, 283 – 290.
- Ullman C., Rhodes M., Cline D., Hanson T.R., Davis D.A. (2019 a). Effects of Four Different Feeding Techniques on the Pond Culture of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* **50**, 54-64.
- Ullman C., Rhodes M.A., Davis D.A. (2019 b). Feed management and the use of automatic feeders in the pond production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* **498**, 44-49.
- Wassenberg T.J., Hill B.J. (1987). Natural diet of the tiger prawns *Penaeus esculentus* and *P. semisulcatus*. *Marine and Freshwater Research* **38**, 169-182.

Concentrados de Proteína Vegetal en el Crecimiento y Respuesta Inflamatoria en Trucha Arcoíris

Luis Héctor Hernández Hernández, Adriana Araceli Trujano Rodríguez, Omar Angeles
López

Laboratorio de Producción Acuícola (Acuario), UNAM FES Iztacala,
Avenida de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México,
C.P. 54090. Tel. y fax (52) 55 56231197, Correo electrónico: luish3@yahoo.com

Resumen

En México, el cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) tiene una tasa de crecimiento en los últimos 10 años del 8.4%. A pesar de la importancia del cultivo de esta especie, existe poca investigación y particularmente con el desarrollo de formulaciones de alimentos. El Laboratorio de Producción Acuícola desarrolló una formulación con una base de concentrados de proteína de soya, arroz y maíz, como fuentes exclusivas de proteína en alimentos de trucha arcoíris. Aquí presentamos algunos de los resultados obtenidos a lo largo de 2 años de trabajo con esta formulación en diferentes estadios de desarrollo de los organismos. Los resultados muestran que la dieta no afectó el crecimiento de organismos de más de 8 g y no se observó un efecto inflamatorio en las muestras histológicas del intestino de los organismos. Sin embargo, en organismos pequeños (de 0.5 g) se observó un menor crecimiento, no se observó afectación en algunos parámetros de química sanguínea. Aunque es necesario contar con mayor información sobre el uso de este alimento, particularmente en el largo plazo, se considera la posibilidad de utilizarlo a un nivel productivo.

Palabras clave: Concentrados de proteína vegetal, crecimiento, respuesta inflamatoria, trucha arcoíris

Introducción

El rápido crecimiento de la acuicultura durante los últimos 20 años se ha acompañado por una demanda creciente de alimentos balanceados (Gatlin *et al.* 2007). Los productos de pescado, como la harina y el aceite, representan las fuentes más importantes de proteína y lípidos de la mayoría de las dietas comerciales. Sin embargo, no hay expectativa de que la producción global de ambos, de harina y de aceite, se incremente más allá de los niveles actuales (Hardy 1996) y en unos pocos años la demanda sobrepasará al suministro (Gatlin *et al.* 2007). Además de que la disponibilidad no será suficiente, existe un continuo incremento de los costos, que se reflejan en el precio final de las dietas manufacturadas. Así que las dietas con una base de productos de pescado no serán sustentables con respecto al incremento de la demanda ocasionada por el rápido crecimiento de la producción de la acuicultura global.

Los productos de origen vegetal, tales como las harinas y aceites de cereales y semillas oleaginosas, son alternativas a los productos de pescado (Hardy 2010). En el caso de las harinas todavía tienen un uso limitado, pues los cereales y las semillas, contienen compuestos que afectan la digestibilidad, el crecimiento normal (Krogdahl *et al.* 2010) y la respuesta inmunológica e inflamatoria (Burrells *et al.* 1999). Estos compuestos se conocen como anti-nutrientes y son parte integral de las semillas como moléculas estructurales (como las fibras), de almacenamiento (como el ácido fitico) y de defensa (como las lectinas) (Krogdahl *et al.* 2010). Por tanto, productos refinados provenientes de las harinas pueden utilizarse y los más prometedores son los concentrados de proteína (Hardy 2010). Los concentrados de proteína de cereales y semillas oleaginosas usualmente contienen altos niveles de proteína, además de concentraciones bajas de anti-nutrientes y aunque se ha reportado que los concentrados de proteína no causan enteritis intestinal en salmónidos (Refstie *et al.* 2001; Hardy 2010), existe poca información sobre cómo estos compuestos afectan al sistema inmune y la respuesta inflamatoria en el sistema digestivo de peces (Zhou *et al.* 2017).

La industria de la producción de trucha arcoíris en México se considera como pequeña (solo 14,197 toneladas producidas en 2017), pero con altas ganancias, pues en 2017 alcanzó la octava posición por su valor económico de las especies cultivadas en el país (CONAPESCA 2017). A pesar de la importancia del cultivo de la trucha, existe poca investigación en esta especie y particularmente en el desarrollo de nuevas formulaciones de alimentos, además de

que las dietas comerciales disponibles todavía tienen como base a la harina y el aceite de pescado. Recientemente en el Laboratorio de Producción Acuícola se desarrolló una formulación con una base de concentrados de proteína de soya, arroz y maíz, como fuentes exclusivas de proteína en alimentos de trucha arcoíris. Aquí presentamos algunos de los resultados obtenidos a lo largo de 2 años de trabajo con esta formulación.

Producción de concentrados de proteína vegetal

Como se ha mencionado, los concentrados de proteína vegetal son productos derivados de cereales y semillas oleaginosas que mediante diversos procesos químicos y físicos, se eliminan sustancias (lípidos, carbohidratos y compuestos anti-nutricionales) y se aumenta la concentración de proteína. A continuación, se presenta de forma breve, los procesos de elaboración de los concentrados de proteína de soya, arroz y maíz que se utilizan en los alimentos de trucha arcoíris.

En el caso del concentrado de proteína de soya (CPS) se deriva de “hojuelas blancas”, producidas a partir de los frijoles de soya que han sido descascarillados, cortados en hojuelas y a las que se les extraído los lípidos con hexano. Una vez que se han secado, a las hojuelas se les extrae de nueva cuenta, compuestos saborizantes y azúcares con etanol o agua ácida. Este proceso permite aumentar el contenido de proteína hasta un máximo de 70% (Preece *et al.* 2017).

Para el caso del concentrado de proteína de arroz (CPA), este se deriva usualmente del salvado (producto secundario obtenido del pulido del arroz integral a arroz blanco) y aunque existen diversos métodos para concentrar la proteína, el más común se realizará con una extracción alcalina, seguida por una precipitación al pH isoelectrico de la proteína (Shih 2003). En este caso, el contenido máximo de proteína es de 70%.

Finalmente, el concentrado de proteína de maíz (CPM y conocido también como gluten de maíz) es un subproducto resultado de la molienda húmeda de la semilla de maíz y comúnmente tiene un contenido máximo de 60% de proteína cruda (Carrillo *et al.* 2019).

Desarrollo de la dieta con los concentrados de proteína vegetal

En el Laboratorio de Producción Acuícola se han desarrollado diferentes formulaciones con proteínas de origen vegetal para trucha arcoíris, muchas de ellas basadas en diferentes productos derivados de soya (Cruz *et al.* 2011; Hernández *et al.* 2012; Aguillón *et al.* 2017), incluyendo al CPS (Hernández *et al.* 2017). Conforme más productos de origen vegetal están disponibles en el mercado nacional, algunos se han probado de forma individual como en el caso del CPM (Carrillo *et al.* 2019) y el CPA (datos sin publicar) y que mostraron generar una buena respuesta en el crecimiento de la trucha, en sustituciones parciales de la harina de pescado. Con esta información, se formuló la dieta considerando aportes del 40% del CPS, 40% del CPA y 20% del CPM de la porción de la proteína. La dieta (DConcen) se formuló para contener un mínimo de 40% de proteína cruda y 15% de lípidos (Tabla 1).

Tabla 1. Formulación de la dieta con concentrados de proteína vegetal para trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*.

Ingredientes	g/kg dieta
Concentrado de proteína de soya ¹	200
Concentrado de proteína de arroz ²	200
Concentrado de proteína de maíz ³	150
Aceite de pescado	100
Lecitina de soya	50
Dextrina	100
Mezcla vitamínica y minerales	40
Aglutinante	50
α -celulosa	110

¹Profine E, Vimifos S.A. de C.V., Mexico.

²Remy Pro 80+, Palsgraad Industri de Mexico S. de R.L. de C.V., Mexico.

³Glutimex, Ingredion Mexico S.A. de C.V., Mexico.

Durante la primera prueba de alimentación con la dieta DConcen, se utilizaron organismos con peso inicial de 7.0 ± 0.06 g (media $\pm$ error estándar) y que se obtuvieron de la granja privada “Valle de la Luna”, minicipio de Isidro Fabela, Estado de México. Como alimento

Hernández Hernández, L.H., Trujano Rodríguez, A.A., Angeles López, A. 2019. Concentrados de Proteína Vegetal en el Crecimiento y Respuesta Inflamatoria en Trucha Arcoíris. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisiones en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 296-309.

control, se utilizó una dieta comercial. Cada dieta se dio a grupos por cuadruplicado con 40 organismos cada uno. La prueba de alimentación tuvo una duración de 60 días y al termino, se determinó el crecimiento y la deposición de proteína en músculo y la actividad de la lisozima en el suero. Los datos obtenidos se analizaron con un ANOVA de una variable y en caso de encontrar diferencias, se uso una prueba de LSD de Fisher ($P < 0.05$).

En la Tabla 2 se muestra el crecimiento de los organismos y aunque no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, se observaron valores más altos de ganancia en peso (GP) y de la tasa de crecimiento específico (TCE) en los organismos alimentados con la DConcen.

Tabla 2. Crecimiento de crías de trucha arcoíris alimentadas con una dieta con concentrados de proteína vegetal por un periodo de 60 días. Los datos representan la media $\pm$ error estandar. No se observaron diferencias significativas a este nivel ($P < 0.05$)

	Tratamiento	
	DConcen	Control
GP ¹ (%)	203 $\pm$ 20	165 $\pm$ 41
TCE ² (%/día)	1.8 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.3
TED ³	0.05 $\pm$ 0.001	0.04 $\pm$ 0.007
TEP ⁴	0.1 $\pm$ 0.003	0.1 $\pm$ 0.02
Supervivencia (%)	87.5	75

¹Ganancia en peso = [(peso final - peso inicial)/peso inicial] x 100;

²Tasa de crecimiento específico = [(ln peso final - ln peso inicial)/60] x 100;

³Tasa de eficiencia de la dieta = ganancia de peso / alimento consumido en base seca (g);

⁴Tasa de eficiencia de la proteína = ganancia de peso / proteína consumida en base seca (g).

No se observaron diferencias en el contenido de proteína en el músculo, aún cuando se obtuvo un mayor porcentaje en los organismos alimentados con la dieta control (DConcen, 65 $\pm$ 0.7 %; Control, 78 $\pm$ 5% en base seca).

Respecto a la actividad de la lisozima en el suero, se obtuvo un valor significativamente más alto en los organismos alimentados con la dieta DConcen (5 $\pm$ 0.001 U/mg proteína) que el de aquellos alimentados con la dieta control (3 $\pm$ 0.001 U/mg proteína).

En una segunda prueba de alimentación con la dieta, se utilizaron crías del Centro de Producción Acuícola “El Zarco” (municipio de Ocoyoacac, Estado de México) con un peso

Hernández Hernández, L.H., Trujano Rodríguez, A.A., Angeles López, A. 2019. Concentrados de Proteína Vegetal en el Crecimiento y Respuesta Inflamatoria en Trucha Arcoíris. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisiones en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 296-309.

inicial de 0.59 ± 0.004 g (promedio $\pm$ desviación estandar). Se utilizó la dieta DConcen y una dieta comercial como control. Cada dieta se dió a grupos por triplicado de 30 organismos por un periodo de 60 días. Al finalizar los organismos se pesaron, se tomaron muestras de músculo e hígado para determinar el contenido de proteína y lípidos, finalmente se extrajo sangre para las determinaciones de glucosa, proteína y triglicéridos en el suero. Los datos se analizaron con un ANOVA y cuando se encontraron diferencias significativas, se realizó una prueba LSD de Fisher ($P < 0.05$).

En la Tabla 3 se muestran la GP y TCE de esta segunda prueba de alimentación y se observaron valores más altos en los organismos alimentados con la dieta Control, pero no se encontraron diferencias significativas.

Tabla 3. Crecimiento de crías de trucha arcoíris alimentadas con una dieta con concentrados de proteína vegetal por un periodo de 60 días. Los datos representan la media $\pm$ error estandar. No se observaron diferencias significativas a este nivel ($P < 0.05$).

Tratamiento	GP ¹ (%)	TCE ² (%/día)
Control	1047 $\pm$ 134	4.1 $\pm$ 0.2
DConcen	720 $\pm$ 63	3.5 $\pm$ 0.05

¹Ganancia en peso = [(peso final - peso inicial)/peso inicial] x 100;

²Tasa de crecimiento específico = [(ln peso final - ln peso inicial)/60] x 100

La Tabla 4 muestra los contenidos de proteína y lípidos en el músculo e hígado y no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 4. Contenido de proteína y lípidos en músculo e hígado de crías de trucha arcoíris alimentadas con una dieta con concentrados de proteína vegetal por un periodo de 60 días. Los datos representan la media $\pm$ error estandar. No se observaron diferencias significativas a este nivel ($P < 0.05$).

Tratamiento	Proteína (% base húmeda)		Lípidos (% base húmeda)	
	Músculo	Hígado	Músculo	Hígado
Control	16.3 $\pm$ 0.5	13.6 $\pm$ 1.3	12.1 $\pm$ 1	4.6 $\pm$ 0.4
DConcen	16.3 $\pm$ 0.9	12.9 $\pm$ 1.2	9.8 $\pm$ 0.6	5.7 $\pm$ 0.4

Hernández Hernández, L.H., Trujano Rodríguez, A.A., Angeles López, A. 2019. Concentrados de Proteína Vegetal en el Crecimiento y Respuesta Inflamatoria en Trucha Arcoíris. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisiones en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 296-309.

Respecto a la química sanguínea (Tabla 5), no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de proteína y triglicéridos en el suero sanguíneo de las crías. Sin embargo, la concentración de glucosa fue significativamente más alta en el suero de las crías alimentadas con la dieta DConcen, que las alimentadas con la dieta Control.

Tabla 5. Parametros de química sanguínea de crías de trucha arcoíris alimentadas con una dieta con concentrados de proteína vegetal por un periodo de 60 días. Las medias con letras diferentes en la misma columna, difieren significativamente ($P < 0.05$).

Tratamiento	Proteína ($\mu\text{g/ml}$)	Trigliceridos (mg/dl)	Glucosa ($\text{nmol}/\mu\text{l}$)
Control	0.36 ± 0.05	112 ± 33	$0.34 \pm 0.1a$
DConcen	0.34 ± 0.01	91 ± 21	$0.96 \pm 0.03b$

En una prueba más, realizada con organismos leucocísticos con un peso inicial de 240 ± 5 g, se alimentaron con la dieta DConcen durante un periodo de 60 días. Como dieta comercial se utilizó un alimento comercial. Las dietas se ofrecieron a grupos por cuadruplicado de 5 organismos. Al finalizar, se determinó el peso y se tomaron muestras del intestino para un análisis histológico de la parte proximal y distal, utilizando la tinción de hematoxilina y eosina. Los datos de crecimiento se analizaron con un ANOVA y cuando se encontraron diferencias significativas, se uso una prueba de LSD de Fisher ($P < 0.05$).

En la Tabla 6 se muestran los valores de GP, TCE y supervivencia de los organismos leucocísticos y no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. De hecho, el crecimiento de los organismos fue muy similar en ambos grupos.

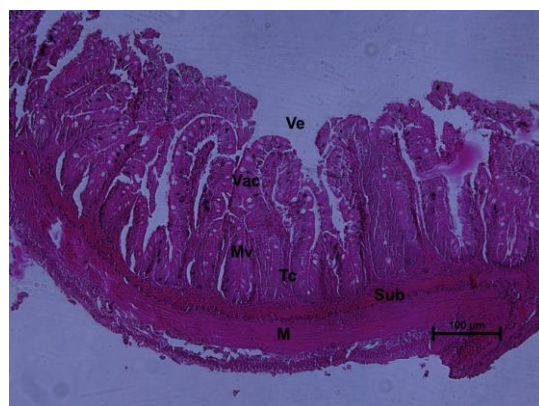
Tabla 6. Crecimiento y supervivencia de juveniles leucocísticos de trucha arcoíris (obtenidos de la ganja privada “Rancho El Xote”, municipio de Jilotzingo, Estado de México) alimentadas con una dieta con concentrados de proteína vegetal por un periodo de 60 días. Los datos representan la media $\pm$ error estandar. No se observaron diferencias significativas a este nivel ($P < 0.05$).

Tratamiento	GP ¹ (%)	TCE ² (%/día)	Supervivencia (%)
Control	45.9 $\pm$ 3.2	0.62 $\pm$ 0.03	80
DConcen	45.1 $\pm$ 6.8	0.61 $\pm$ 0.07	100

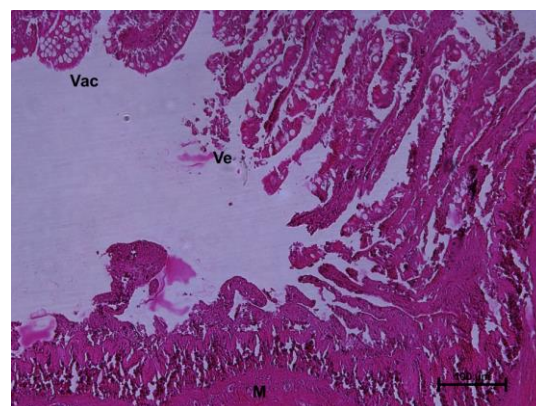
¹Ganancia en peso = [(peso final - peso inicial)/peso inicial] x 100;

²Tasa de crecimiento específico = [(ln peso final - ln peso inicial)/60] x 100

Respecto a los análisis histológicos, se presentan en la Figura 1 los cortes transversales de la porción proximal del intestino. En las observaciones al microscopio, no se observaron anomalías en esta sección del intestino en los organismos alimentados con la dieta DConcen (c) cuando se comparó con las muestras obtenidas previas (pre-tratamiento) al inicio de la prueba de alimentación (a) y los organismos alimentados con la dieta Control (b). En general se observó que la parte proximal del intestino mantuvo la integridad después de 60 días de la alimentación con la dieta de concentrados.



(a)



(b)

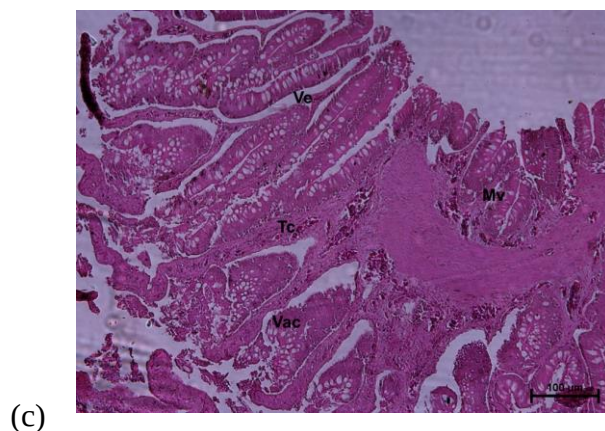
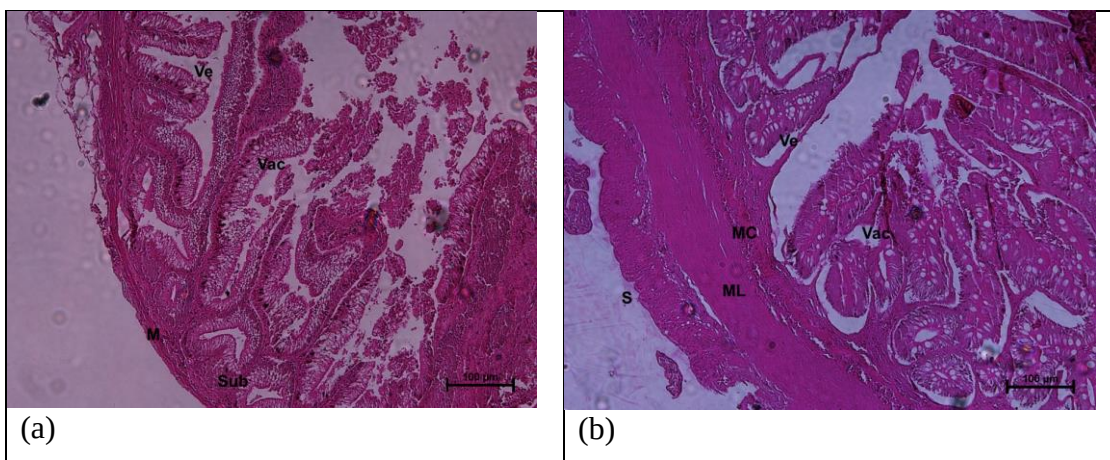


Figura 1. Cortes transversales de la porción proximal del intestino de truchas juveniles leucocíticas (a) pre-tratamiento, (b) alimentadas con la dieta Control y (c) alimentadas con la dieta DConcen (x100). M= músculo; Sub= submucosa; Te= tejido epitelial; Tc= tejido conectivo; Mv= microvellosidades; Vac= vacuolas; Ve= vellosidades.

De la misma forma, en la parte distal del intestino (Figura 2) no se observaron anomalías o inflamación en los organismos alimentados con la dieta DConcen (c) cuando se compararon con las muestra histológicas de los organismos iniciales (a) o de los que se alimentaron con la dieta Control (b).



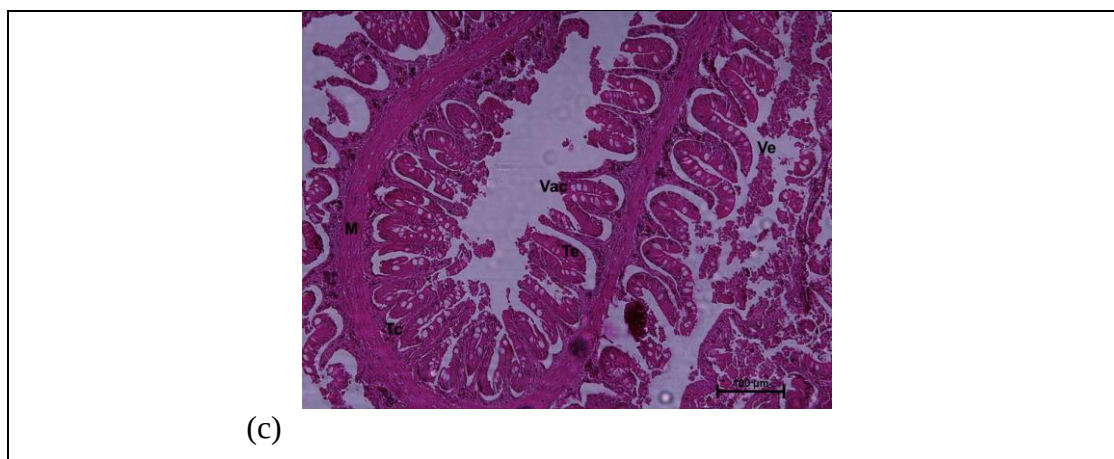


Figura 2. Cortes transversales de la porción distal del intestino de truchas juveniles leucocíticas (a) pre-tratamiento, (b) alimentadas con la dieta Control y (c) alimentadas con la dieta DConcen (x100). M= músculo; Sub= submucosa; Te= tejido epitelial; Tc= tejido conectivo; Mv= microvellosidades; Vac= vacuolas; Ve= vellosidades; Mc= músculo liso circular; ML= músculo liso longitudinal.

Discusión y conclusiones

De acuerdo con Hardy (2010) las fuentes de proteína más promisorias para incluirse en los alimentos acuícolas son los concentrados de proteína derivados de cereales y semillas oleaginosas. Durante el proceso de elaboración de los concentrados una parte de los compuestos, que potencialmente pueden afectar el crecimiento y causar enteritis en el intestino, son eliminados y a la par la porción de la proteína aumenta. En los alimentos de salmonidos los concentrados de proteína, pueden reemplazar hasta el 75% de la harina de pescado (Refstie *et al.* 2001) sin afectar el crecimiento y la salud intestinal de los organismos. De acuerdo con Collins *et al.* (2013), la mezcla de diferentes fuentes de proteína vegetal es necesaria para reemplazar al 100% a la harina de pescado en los alimentos de salmonidos, ya que ningún ingrediente de origen vegetal por si solo puede generar un crecimiento normal en los peces. Considerando estos aspectos, en el Laboratorio de Producción Acuícola se ha trabajado durante 2 años con un alimento formulado con concentrados de proteínas de soya, arroz y maíz en diferentes pruebas de alimentación con trucha arcoíris.

Los resultados de estas pruebas de alimentación, hasta ahora obtenidos muestran que la dieta DConcen no afecta el crecimiento de la trucha arcoíris cuando los organismos tuvieron un peso mayor a los 8 g. Las dos pruebas realizadas con organismos mayores a este peso, tuvieron un crecimiento similar a los alimentados con una dieta comercial que sirvió de control y no observó ningún tipo de alteración inflamatoria del tejido del intestino proximal o distal en los organismos que se alimentaron con los concentrados de proteína vegetal. La respuesta inflamatoria inducida por compuestos de origen vegetal, se caracteriza por el acortamiento de los pliegues primarios y secundarios de la lamina propia, la cual se infiltra con diversas células relacionadas con la inflamación tales como los macrófagos, linfocitos y células granulares eosinófilas y neutrófilas (Krogdahl *et al.* 2010). En los cortes de los intestinos no se observaron este tipo de características.

Sin embargo, en organismos de una talla menor, se observó que las proteínas de origen vegetal tuvieron un efecto negativo en el crecimiento. Los parámetros de la química sanguínea en estos organismos fueron similares a los del control, excepto la concentración de glucosa. Aunque no tenemos un panorama claro sobre porqué los organismos de menor peso no crecen al mismo ritmo que los de talla mayor cuando se alimentan con la dieta DConcen, es probable que los peces no sean capaces de utilizarla debido al desarrollo incipiente del sistema digestivo, principalmente de las enzimas digestivas. Otro factor que podría influir en el crecimiento cuando se usa el alimento DConcen, es el origen de los organismos. En las pruebas de alimentación se utilizaron organismos de tres diferentes lugares, dos granjas particulares y un centro de producción gubernamental, los cuales están dedicados básicamente a la venta de organismos y sin programas de selección. Al menos una de las granjas (Xote), ha importado lotes de reproductores para aumentar la variabilidad genética de sus crías y es posible que se encuentren organismos capaces de utilizar de mejor forma los ingredientes de origen vegetal. Sin duda, la selección de truchas con características particulares, como la utilización de ingredientes de origen, es un campo de investigación que no se ha desarrollado en el país y con potencial para mejorar el cultivo (Hernández y Carrillo 2018). Esto ya se ha desarrollado en otros países como Estados Unidos (Overturf 2016).

Desde un punto de vista económico, los concentrados de proteína se consideran como más costosos que otros ingredientes, debido a los procesos de refinación para la obtención de la fracción de la proteína. De acuerdo con los últimos datos que tenemos disponibles el precio

Hernández Hernández, L.H., Trujano Rodríguez, A.A., Angeles López, A. 2019. Concentrados de Proteína Vegetal en el Crecimiento y Respuesta Inflamatoria en Trucha Arcoíris. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds). Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 296-309.

de los concentrados de soya y de arroz tiene un precio promedio por kilogramo de 2.20 dolares (alrededor de 40 pesos mexicanos) y el del gluten de maíz es de 0.50 dolares (10 pesos). Por otro lado, el precio de la harina de pescado tiene un precio promedio de 1.50 dolares (aproximadamente 30 pesos mexicanos); por ende (y a un nivel experimental) el alimento DConcen es más caro incluso que un alimento hecho 100% con harina de pescado. A pesar de esto y de que es necesario contar con mayor información sobre el uso de este alimento, por ejemplo su efecto a largo plazo (prueba de alimentación mayor a 6 meses) y respuestas más finas como la expresión de genes blanco (respuesta inflamatoria e inmunológica), se considera como un candidato para utilizarse bajo condiciones más practicas de cultivo.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la DGAPA UNAM, proyecto IN214718.

Referencias

- Aguillón H.O.E., Hernández H.L.H., Shimada M.A., Garduño L.M. (2018) Effects of diets with whole plant-origin proteins added with different ratios of taurine:methionine on the growth, macrophage activity and antioxidant capacity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Veterinary and Animal Science* **3**: 4-9.
- Burrells C., Williams P.D., Southgate, P.J., Crampton V.O. (1999) Immunological, physiological and pathological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **72**, 277- 288.
- Carrillo L.J.A., Sánchez A.D., Hernández H.L.H., Angeles L.O., Fernández A.M.A. (2017) Reemplazo de harina de pescado con gluten de maíz en dietas de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*): efectos en crecimientos y otros parámetros fisiológicos. *Hidrobiológica* **28**, 257-263.
- Collins S.A., Øverland M., Skrede A., Drew M.D. (2013) Effect of plant protein sources on growth rate in salmonids: meta-analysis of dietary inclusion of soybean, pea and canola/rapeseed meals and protein concentrates. *Aquaculture* **400-401**, 85-100.
- CONAPESCA 2017. Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2017. CONAPESCA. México. 293 p.
- Cruz C.C.A., Hernández H.L.H., Fernández A.M.A., Ramírez P.T., Angeles L.O. (2011) Effects of diets with soybean meal on the growth, digestibility, Phosphorus and Nitrogen excretion of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Hidrobiológica* **21**: 118-125.
- Gatlin D.M., Barrows F.T., Brown P., Dabrowski K., Gaylord T.G., Hardy W.R., Herman E., Hu G., Krogdahl Å., Nelsom R., Overturf K., Rust M., Sealey W., Skonberg D., Souza E.J., Stone D., & Wilson R. (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research* **38**: 551-579.
- Hardy R.W. (1996) Alternate protein sources for salmon and trout diets. *Animal Feed Science and Technology* **59**: 71-80.
- Hardy R.W. (2010) Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* **41**: 770-776.
- Hernández F.G., Hernández H.L.H., Fernández A.M.A., Angeles L.O. (2012) Effects of total replacement of fishmeal with *Spirulina* powder and soybean meal on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh IJA* **64.2012.790**: 1-8.
- Hernández H.L.H., Fernández A.M.A., Hernández A.G.Y. (2017) Effects of plant-based on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). In: *Tilapia and trout. Harvesting, prevalence and benefits* (ed. by B. Richardson). pp. 157-166. Nova Science Publishers, Inc, New York.
- Hernández H.L.H., Carrillo, L.J.A. (2018). Cultivo de trucha arcoíris en México: resto que enfrenta la producción sustentable. *Ciencia Pesquera* **26**: 59-64.

- Krogdahl Å, Penn M., Thorsen J., Refstie S. and Bakke A.M. (2010) Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding response in salmonids. *Aquaculture Research* **41**: 333-344.
- Overturf K. (2016) Understanding the biology behind selective improvement of rainbow trout for commercially important traits. *Journal of Animal Science* **94**: 10-11.
- Preece K.E., Hooshyar N., Zuidam N.J. (2017) whole soybean protein extraction processes: a review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **43**: 163-172.
- Refstie S., Storebakken T., Baeverfjord G., Roem A.J. (2001) Long-term protein and lipid growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with partial replacement of fish meal by soy protein products at medium or high lipid level. *Aquaculture* **193**: 91-106.
- Shih F.F. (2003) An update on the processing of high-protein rice products. *Nahrung/Food* **47**: 420-424.
- Zhou Z., Ringø E., Olsen R.E, Song S.K. (2018) Dietary effects of soybean products on gut microbiota and immunity of aquatic animals: A review. *Aquaculture Nutrition* **24**: 644-665

Subproductos del Calamar en Acuicultura: Estudios Químico Estructurales

Josafat Marina Ezquerra Brauer

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Blvd.

Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro, 83000. Apdo. Postal 1658. Hermosillo,

Sonora. México. email: josafat.ezquerra@unison.mx

Resumen

Solo del 50-60% de la materia prima de la industria pesquera es empleada para consumo humano directo, mientras que el resto se considera basura, lo cual es comúnmente utilizado como productos de bajo valor o se desecha al mar. Dentro de las pesquerías importantes está la de los calamares. Diferentes compuestos bioactivos (proteínas, lípidos, minerales, vitaminas, enzimas, biopolímeros, entre otros) a partir de los desechos del calamar (piel, cabeza, aletas, vísceras, tentáculos, productos de menor talla comercial) han sido identificados. Se ha reportado que el uso de los subproductos del calamar como ingredientes en dietas experimentales mejoró el crecimiento y la sobrevivencia de organismos cultivados, como los camarones. De los principales procesos aplicados en los subproductos de calamar y aplicados en el cultivo de camarones es el de la obtención de hidrolizados proteícos. Se ha reportado además que las propiedades bioactivas de los hidrolizados pueden verse afectadas por las condiciones de obtención de dichos hidrolizados y que dichas propiedades bioactivas a su vez están relacionadas con las características químicoestructurales de los péptidos generados durante la hidrólisis. Para proporcionar una mayor comprensión del empleo de los subproductos del calamar como potenciales ingredientes durante el cultivo de camarones, en este trabajo se hace una revisión de lo que se ha publicado sobre el efecto de condiciones de obtención de hidrolizados proteícos a partir de dichos desechos sobre las características químico-estructurales de los péptidos bioactivos producidos.

Palabras claves: calamar, subproductos, propiedades químico-estructurales

Squid By-Products in Aquaculture: Studies on Chemical Structure

Josafat Marina Ezquerra Brauer

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Blvd.

Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro, 83000. Apdo. Postal 1658. Hermosillo,

Sonora. México. email: josafat.ezquerra@unison.mx

Abstract

Only 50-60% of the seafood raw material is used for direct human consumption whereas the remaining is considered processing waste, which is commonly used for low-valued products or disposed at sea. Among marine species, squid species represents one important fishery. Different bioactive and profitable compounds (proteins, lipids, minerals, vitamins, enzymes, bio-polymers, among others) from squid-byproducts (skin, head, fins, viscera, tentacles, unclaimed mantle,) have been identified. It has been reported that the use of squid by-products as ingredients in experimental diets improved the growth and survival during the culture of as shrimps. Moreover, it is known that variations in the hydrolytic procedure could generate modifications in the molecular structure, which may influence the bioactive properties of the resulting peptides. To provides an in-depth understanding of squid by-products as aquaculture feed ingredients studies, in this review updates information about the effect of squid hydrolysates conditions process on the chemical-structure properties of the bioactive peptides produced.

Keywords: squid, by-products, chemical-structure properties

Introducción

La industria pesquera ha mantenido un crecimiento sostenido en las últimas cinco décadas (FAO, 2017). Vinculado con el incremento de la producción de pescado, la generación de diversos subproductos pesqueros, tratados de manera tradicional como basura, ha aumentado notablemente, sobre todo en aquellas poblaciones próximas a los puertos donde operan las flotas pesqueras. Por lo que es importante establecer estrategias de aprovechamiento de estos subproductos que coadyuvaría a reducir el impacto negativo que los mismos tienen en el medio ambiente, ya que existen varias industrias en las cuales pueden tener aplicación, como lo es la del cultivo de organismos marinos (Córdova-Murueta y García-Carreño 2002; Arias-Moscoso *et al.*, 2015a; González-Félix *et al.*, 2016).

Una alternativa de aprovechamiento de los subproductos de la pesca es la producción de hidrolizados. En estudios donde se han evaluado a hidrolizados proteicos elaborados a partir de calamar, se estableció que éstos poseen alta actividad antioxidante, anticancerígena y antihipertensiva (Alemán *et al.*, 2011; Suárez-Jiménez *et al.*, 2015, 2019).

Por otro lado, un punto relevante de los desechos pesqueros es que son ricos en enzimas proteolíticas (Sikorski y Kolodziejaska, 1986) y estas proteasas pueden ser aprovechadas para producir hidrolizados (Lian *et al.*, 2005; Sánchez-Alonso *et al.*, 2007).

Es importante hacer notar que las propiedades funcionales de los hidrolizados, tales como su capacidad de impactar en el desarrollo de organismos cultivados, depende de varios factores,

tales como el pH, la temperatura, fuente usada como proteína, tipo de sistema enzimático, entre otros. En varios trabajos se ha reportado que las propiedades bioactivas de los hidrolizados están influenciadas por sus características químico-estructurales, como son distribución del peso molecular, composición de aminoácidos, hidrofobicidad de superficie, entre otros (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014; Arias-Moscoso *et al.*, 2015a; Cuevas-Acuña *et al.*, 2015; Suárez-Jiménez *et al.*, 2015, 2019).

Dentro de las diversas técnicas para llevar a cabo la caracterización químico estructural de los hidrolizados de calamar se tienen a las espectrofotométricas, siendo las más utilizadas la resonancia magnética nuclear (RMN), espectrofotometría de infrarrojo (FTIR), dispersión de rayos X, fluorometría y quimioluminiscencia. Lin y Ba-fang (2006) al aplicar la técnica de quimioluminiscencia detectaron la presencia de radicales hidróxido en hidrolizados de la gelatina obtenida de la piel del calamar. Sánchez-Sánchez *et al.* (2014) mediante fluorometría determinó la hidrofobicidad de hidrolizados de la proteína extraída del calamar. Mientras que otros investigadores han empleado la fluorometría para la determinación de la capacidad antioxidante de hidrolizados de gelatina e hidrolizados del calamar (Cuevas-Acuña *et al.*, 2016; Suárez-Jiménez *et al.*, 2019). Así mismo se ha reportado que los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrofotometría de infrarrojo (FTIR), que brindan una mayor información estructural de las proteínas, se ven afectados tanto por el tipo de subproductos de calamar y las condiciones de procesamiento, tales como las enzimas empleadas durante un proceso de hidrólisis o el pH (Arias-Moscoso *et al.*, 2015a; Sarabia-Sainz *et al.*, 2017; Suárez-Jiménez *et al.*, 2019).

En este trabajo se hace una revisión de lo que se ha publicado sobre la caracterización química-estructural de los subproductos del calamar gigante, enfocada principalmente a los hidrolizados proteicos producidos de dichos subproductos. Los trabajos serán discutidos y analizados abordando los siguientes aspectos:

- (1) La relación detectada entre el tipo de subproducto, condiciones de obtención y las propiedades químico-estructurales.
- (2) La relación entre las propiedades químico-estructurales y el desarrollo del camarón blanco en cultivo.
- (3) La relación entre las propiedades químico-estructurales con la actividad biológica de los péptidos producidos.

Generalidades del músculo del calamar gigante

En términos generales se ha establecido que el músculo del calamar gigante está constituido por alrededor del 37% de compuestos nitrogenados no proteicos y bajo contenido de lípidos (Sikorski y Kolodziejska 1986). Partiendo de esta información, se ha establecido que los subproductos del calamar, tales como la piel, vísceras, aletas, tentáculos, entre otros, pueden servir como materia prima para la obtención de proteínas (Alemán *et al.*, 2011, Uriarte-Montoya *et al.*, 2011), o para la elaboración de hidrolizados proteicos como suplemento dentro de dietas para acuicultura (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014).

Subproductos de calamar

El aumento en los volúmenes de producción pesquera y acuícola a nivel mundial ha propiciado un incremento en la generación de diversos subproductos pesqueros. Una de las especies que destaca por su volumen de producción y generación de empleos es el calamar, de ésta lo que normalmente se comercializa es el manto, sub-utilizándose la cabeza y la aleta, y se considera a la piel cómo desecho sin valor comercial (Ezquerria-Brauer y Aubourg, 2019). En la pesquería de este molusco, sólo se aprovecha la parte comestible (42%) y el resto es desechado (Ezquerria-Brauer y Aubourg, 2019). Sin embargo, los subproductos del procesamiento de ésta industria pesquera son fuentes valiosas de componentes tales como proteínas, pigmentos, vitaminas, minerales y enzimas (**Tabla 1**), por lo que estos residuos pueden recuperarse y aprovecharse eficientemente no sólo para reducir el impacto ambiental que generan, sino que también tienen o pueden tener un uso potencial en alimentos, fármacos y otras aplicaciones como la acuicultura, convirtiéndose en co-productos y llegar a representar en algunos casos un excelente campo de oportunidades de negocio.

Tabla 1. Subproductos de calamar y algunos productos potenciales con valor agregado

Subproducto	Producto Potencial
Piel	Aditivos Biofilms Colágeno y gelatina Compuestos bioactivos Pigmentos
Aletas	Colágeno y compuestos bioactivos Concentrados proteicos

Cabeza, tentáculos y brazos	Colágeno y gelatina Compuestos bioactivos Aditivos Suplementos en dietas para peces y camarones
Pluma	Quitina
Glándulas digestivas	Enzimas
Adaptado de Ezquerria-Brauer y Aubourg, 2019.	

Aprovechamiento de los subproductos de calamar

El aprovechamiento de las proteínas que pueden ser obtenidas de los desechos pesqueros es un tema que ha despertado interés desde hace algunos años, y uno de los destinos para la utilización de estas proteínas es en la alimentación de organismos cultivados (Kristinson, 2008).

Se han propuesto distintos métodos para el aprovechamiento de los subproductos pesqueros dentro de los cuales se encuentran los hidrolizados enzimáticos. Los hidrolizados obtenidos a partir de productos marinos tienen un efecto benéfico en el desarrollo y crecimiento de diversos animales tanto terrestres como acuáticos.

Alimento para organismos cultivados

La utilización de los subproductos animales para la alimentación es una alternativa importante, ya que además de tener beneficios ambientales se reduce el costo de la producción animal. Para el caso de los subproductos marinos, estos representan una fuente

importante de proteína de alta calidad, así como de energía (Arvanitoyannis y Kassavati, 2008).

Los desechos de trucha (cabeza, vísceras, huesos y cola) son una alternativa a utilizar en las dietas de besugo (Kotzamanis *et al.*, 2001); mientras que los desechos de pescado pueden servir como sustituto de las fuentes comunes de proteína. Así, en diversos estudios realizados en peces, se detectó un efecto benéfico en el desarrollo de estos organismos cuando sus dietas fueron suplementadas con hidrolizados de pescado (Asknes *et al.*, 2006). Sin embargo, se han detectado algunos efectos adversos atribuidos a la gran cantidad de péptidos de bajo peso molecular en los hidrolizados, los cuales pueden inducir un desbalance en el aprovechamiento de los aminoácidos y afectar el desarrollo de organismos como el camarón (Córdova-Murueta y García-Carreño, 2002), aun así se ha establecido que al controlar el grado de hidrólisis y la fuente de proteína los hidrolizados marinos pueden tener grandes beneficios en la salud de las especies cultivadas.

Recuperación de proteínas de los subproductos

La recuperación de proteínas a partir de los desechos de la pesca puede hacerse mediante la aplicación de diversos métodos, los cuáles pueden ser mediante procesos mecánicos, de extracción, o bien por la aplicación de procesos de hidrólisis (Taylor y Himonides, 2007).

Los hidrolizados se definen cómo la proteína que es transformada a componentes más pequeños como péptidos y aminoácidos. Estos hidrolizados pueden obtenerse a partir de la aplicación de tratamientos térmicos, químicos, enzimáticos o por combinación de estos. En

general se ha visto que la hidrólisis enzimática de las proteínas puede mejorar substancialmente sus propiedades (Panyam y Kilara, 1996). En este sentido en algunos países se han realizado esfuerzos para desarrollar productos proteicos tales como los hidrolizados de pescado a partir desechos de la industria procesadora de productos de la pesca.

Hidrolizados proteicos del calamar gigante

El uso de hidrolizados es una de las formas más conveniente de aprovechar las proteínas presentes en los subproductos de calamar, ya que se ha visto, que los péptidos generados a partir de la hidrólisis de algunos subproductos del calamar, principalmente la piel, han podido ser utilizados como suplementos debido a sus propiedades nutracéuticas y funcionales (Alemán *et al.*, 2011; Suárez-Jiménez *et al.*, 2015, 2019).

Para la obtención de hidrolizados se requiere la ruptura de la estructura primaria de las proteínas mediante la aplicación de diversos tratamientos, principalmente químicos o enzimáticos (Vioque *et al.*, 2001).

Las tres principales reacciones que se presentan durante el proceso de hidrólisis (Adler-Nissen, 1986) son:

- 1) La formación de un complejo enzima-sustrato (proteína).
- 2) La ruptura del enlace amídico dando como resultado la liberación de un péptido.
- 3) El péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua.

- 4) El proceso puede reiniciarse sobre uno o ambos péptidos liberados.

La velocidad de las reacciones antes mencionadas y la producción final de los péptidos liberados se ven afectadas por el tipo de método de hidrólisis que se aplique. Dentro de los métodos de hidrólisis proteica se encuentran los siguientes:

- 1) Hidrólisis ácida en donde se usan ácidos fuertes, como el HCl. Sin embargo, hay que hacer notar que este método induce la destrucción de aminoácidos como el triptófano, la serina y la treonina (Alaiz *et al.*, 1992).
- 2) Hidrólisis enzimática. En este método se emplean enzimas proteolíticas, que puede ser endógena (aprovechando las enzimas presentes en el tejido a hidrolizar) o exógena (adicionando enzimas comerciales). Posee la ventaja de que no afecta a ningún aminoácido (Panyam y Kilara 1996).

Actividad biológica de los hidrolizados proteicos de calamar

Los hidrolizados proteicos son ampliamente utilizados como suplementos nutricios, ingredientes funcionales, potenciadores de sabor en alimentos, entre otros (Liu y Chiang, 2007).

Asimismo, se tiene una vasta evidencia científica de la existencia de péptidos biológicamente activos y proteínas derivadas de los subproductos de calmar (**Tabla 2**).

Tabla 2. Propiedades biológicas de hidrolizados de calamar

Especie	Propeidad	Referencia
Calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	Antioxidante	Mendis <i>et al.</i> , 2005
Calamar gigante volador (<i>Dosidicus eschrichtii</i> Steenstrup)	Antioxidante	Lin y Li, 2006
Calamar (<i>Todarodes pacificus</i>)	Inhibidor de tirosinasa y elastasa, Antioxidante Estabilizador en alimentos	Nam <i>et al.</i> , 2008
Calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	Antihipertensiva	Aleman <i>et al.</i> , 2011
Calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	Antimutagéncia Antiproliferativas	Suárez-Jiménez <i>et al.</i> , 2019

Hidrolizados proteicos del calamar gigante en el cultivo de camarón

Independientemente del tipo de sistema de cultivo con el que se trabaje, un punto relevante a considerar es invariablemente la dieta, ya que es considerado como uno de los factores que más impacta en el desarrollo de los organismos, así como en los costos de producción (Carbajal, 1987). Y se ha establecido en numerosos estudios que el calamar es una excelente alternativa de uso para la alimentación de camarones ya que la calidad de este alimento favorece el crecimiento, así como las características nutritivas del producto final (Cruz-Suárez *et al.*, 1987; Córdova-Murueta y García-Carreño, 2002; Lee, y Lian, 2010; Arias-Moscoso *et al.*, 2015b).

En cuanto a la suplementación en dietas para camarones con hidrolizados de calamar, González-Félix *et al.* (2014) reportaron que la adición de los hidrolizados no afectó de manera significativa el peso final ni la supervivencia de los camarones. Sin embargo, Arias-Moscoso *et al.* (2015b) establecieron que la suplementación con hidrolizados de calamar influyó positivamente sobre el peso ganado, supervivencia y biomasa ganada del organismo cultivado.

Se ha reportado que, dependiendo del número de cadenas largas vs cadenas cortas en un hidrolizado, el rendimiento de los organismos puede variar (Córdova-Murueta y García-Carreño, 2002). Por lo que las diferencias detectadas en los estudios antes mencionados pudiesen atribuirse, entre otros factores, a las condiciones de producción de los hidrolizados evaluados como insumos. Si bien en ambos estudios la temperatura aplicada para producir los hidrolizados se mantuvo a 55 °C, el pH empleado fue diferente y este parámetro influye en el grado de hidrólisis y en las masas moleculares de los péptidos producidos (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2013; Arias-Moscoso *et al.*, 2015a). González-Félix *et al.* (2014) mantuvieron el sistema a un pH de 6.0, mientras Arias-Moscoso *et al.* (2015b) probaron dos diferentes pH 5.0 y 7.0. Estas diferencias influyen en los péptidos producidos, y éstas impactarán la actividad de las enzimas presentes en el organismo sujeto de estudio. Al suplementar a organismos con hidrolizados producidos a pH de 7.0 la actividad de enzimas digestivas como las aminopeptidasas y carboxypeptidasas A fueron menores a la de aquellos suplementados con hidrolizados producidos a pH de 5.0. La pregunta que surge es porqué esas diferencias, por ello hay que realizar estudios que permitan conocer más a la molécula, como son los estudios fisicoquímicos y estructurales.

Propiedades fisicoquímicas de los hidrolizados de calamar gigante

Las propiedades fisicoquímicas de los hidrolizados van a determinar su uso, por lo que si se planea utilizarlos como alimento para organismos acuáticos es necesario que posean ciertas propiedades estructurales que aseguren su estabilidad en medio líquido.

En estudios donde se obtuvieron hidrolizados aplicando el sistema de enzimas endógenas, denominado auto-hidrólisis (Arias-Moscoso *et al.*, 2015a) se estableció que los rendimientos eran mayores, que poseían una mayor hidrofobicidad de superficie, un balance de aminoácidos adecuado y sus péptidos presentaban pesos moleculares más altos, al compararse con hidrolizados obtenidos aplicando un sistema enzimático exógeno (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2014).

Las propiedades biofísicas y biológicas de productos a partir de subproductos de la piel del calamar gigante, como la gelatina y pigmentos, se ven influenciadas por las condiciones de obtención dichos productos (Uriarte-Montoya *et al.*, 2011; Aubourg *et al.*, 2016). En cuanto a los hidrolizados se ha documentado que el pH de la reacción afectará además de los rendimientos y las propiedades antes mencionadas (grado de hidrólisis y masas moleculares), el perfil de aminoácidos, los resultados espectrofotométricos obtenidos a través de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) y resonancia magnética nuclear (RMN), así como la hidrofobicidad de las moléculas.

Arias-Moscoso *et al.* (2015a) reportaron que el espectro de FT-IR ($3500\text{-}500\text{ cm}^{-1}$) de hidrolizados obtenidos a pH 5.0 tienden a presentar bandas con una mayor intensidad que

Ezquerro Brauer, J.M. 2019. Subproductos del Calamar en Acuicultura: Estudios Químico Estructurales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 310-332.

aquellos producidos a pH 7.0. Además, detectaron que había un desplazamiento diferente en las bandas ubicadas en las regiones de: $3300\text{-}3172\text{ cm}^{-1}$, $1766\text{-}1712\text{ cm}^{-1}$, $1594\text{-}1567\text{ cm}^{-1}$ y $1243\text{-}1229\text{ cm}^{-1}$. Estas diferencias pueden estar relacionados con la presencia de grupos carboxilo ionizados o no ionizados según hayan sido afectados por el tratamiento de obtención al cual fueron sometidos los hidrolizados. El pH influye en el tipo de enzimas proteolíticas que se activan durante un proceso de autohidrólisis, que a su vez influirán en el tamaño de los péptidos y los aminoácidos que conforman dichos péptidos (Suárez-Jiménez *et al.*, 2015).

Mediante la aplicación de Resonancia magnética nuclear (RMN ^1H) se puede predecir la estructura de cualquier molécula (Wüthrich, 2003). Los principales dominios identificados en los espectros de RMN están relacionados con aminoácidos y agua. La detección de una banda larga cerca de la región $\delta=5.0$ indica la presencia de moléculas de agua, las cuales se encuentran rodeando las cadenas de los aminoácidos actuando como un agente estabilizador mediante la formación de puentes de hidrogeno con las cadenas adyacentes (Fullerton *et al.* 2006). Mientras que la porción de los espectros entre 4.5 y 3.5 ppm se asocia con la resonancia de $\alpha\text{-CH}$ de los aminoácidos. Los desplazamientos químicos 3.5-1.5 ppm indican protones alifáticos unidos a los átomos de carbono Arg, Leu, Lys, Pro, Gly, Asn, Asp e Ile. La última región, 1.5 a 0.5 ppm, indica protones asociados a los átomos de carbonos alifáticos de Val, Leu y Ile. (Edison, 2003; Cavanagh *et al.*, 2006). Aunque el método no puede ser utilizado para la cuantificación de los compuestos, a través de los espectros obtenidos permite realizar estimaciones. Arías-Moscoso *et al.* (2015a) empleando esta técnica reportaron que había un menor número de compuestos en hidrolizados producidos a pH 5 comparados con

los de pH de 7, sugiriendo que en dicho tratamiento había una menor cantidad de aminoácidos disponibles. Esto se puede relacionar con la menor ganancia en peso de camarones alimentados con una dieta suplementada con hidrolizados producidos al mencionado pH de 5 (Arias-Moscoso *et al.*, 2015b).

El tamaño de los péptidos influye en su actividad biológica. Suárez-Jiménez *et al.* (2019) detectaron que péptidos con una masa < 5 kDa presentaban una mayor actividad antioxidante y antimutagénica que aquellos con masa > 10 kDa. (**Figura 1**) La razón de este comportamiento se atribuye a una mayor presencia de péptidos con enlaces más débiles, esto detectado a través de espectrofotometría de infra rojo y a la predominancia de aminoácidos hidrofóbicos detectados en la fracción < 5 kDa (**Figura 1**) (Suárez-Jiménez *et al.*, 2016, 2019).

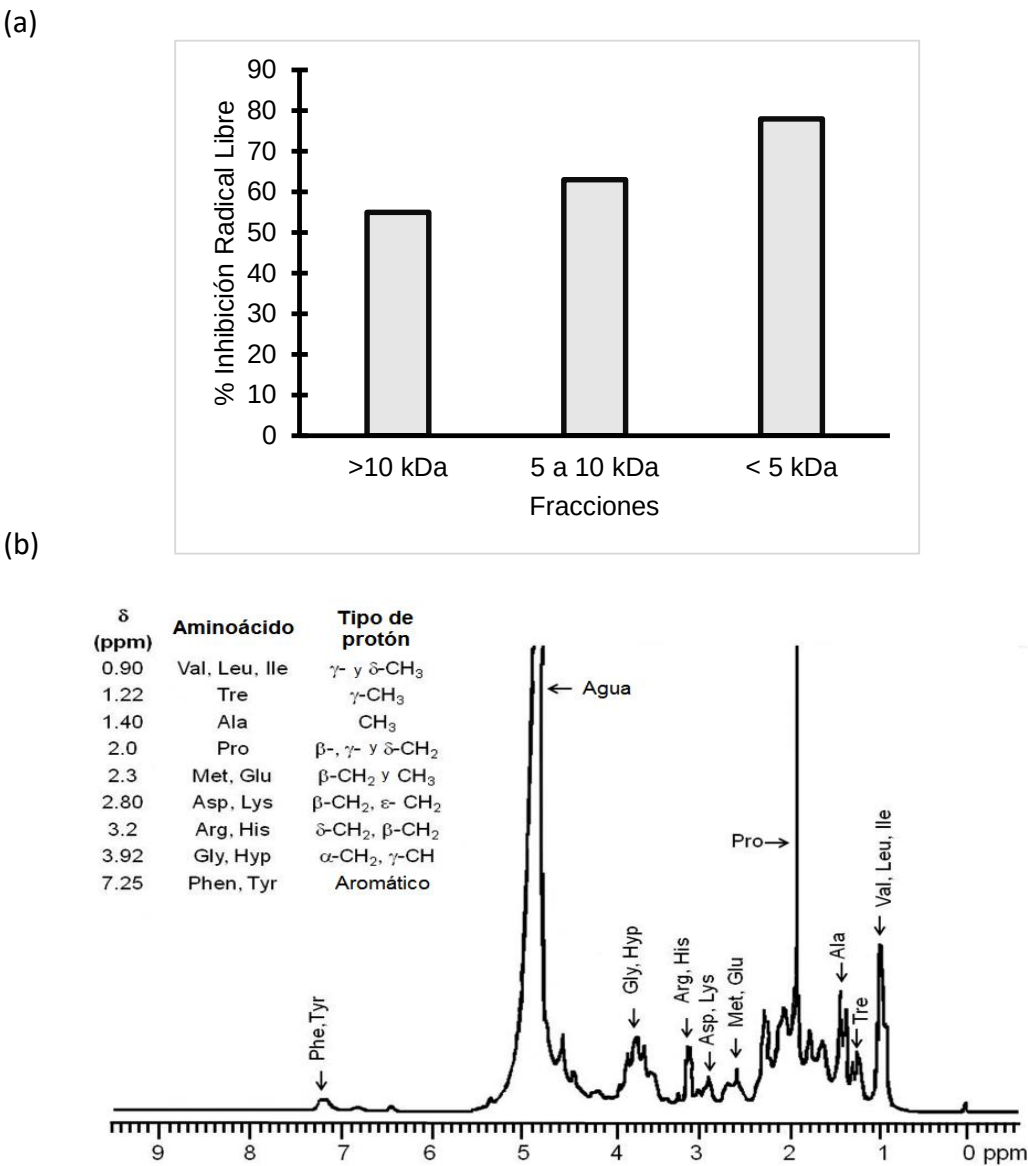


Figura 1. Análisis espectrofotométrico de la fracción peptídica proveniente de hidrolizados de subproductos de calamar, con mayor actividad biológica. (a) Actividad biológica. (b) Espectro de RMN.

Cómo ya se mencionó, tanto el músculo del calamar como sus hidrolizados poseen propiedades únicas que inducen la promoción del crecimiento de organismos en cultivo (Cruz-Suárez *et al.*, 1987; Lee, y Lian, 2010; Arias-Moscoso *et al.*, 2015b). La razón de esto

Ezquerria Brauer, J.M. 2019. Subproductos del Calamar en Acuicultura: Estudios Químico Estructurales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 310-332.

se ha atribuido a la presencia de una molécula de origen proteínico (Cruz y Guillaume, 1983). Dicho factor de crecimiento podría estar relacionado con las diversas bioactividades ya identificadas en las proteínas presentes en el calamar.

Como una estrategia para acercarse a la identificación de dicho factor y otros promotores de crecimiento presente en insumos usados en el cultivo de organismos, se puede comenzar con realizar ensambles de las lecturas de secuenciación del transcriptoma de organismo sujeto de estudio en datos disponibles en GenBank (Guerette *et al.*, 2014). Mediante esta herramienta, en conjunto con la de desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a detector de iones (MALDI-TOF MS) o PCR (comparaciones entre las secuencias de aminoácidos y secuencias de péptidos obtenidos mediante electroforesis bidimensional) se ha logrado identificar péptidos obtenidos de la hidrólisis del músculo del calamar, en los cuáles se ha detectado ya sea actividad antioxidante, antihipertensiva, antimutagénica, antiproliferativa, entre otras.

En los hidrolizados del músculo del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) se detectó que éstos poseían dos péptidos con actividad antioxidante, uno de 1307 Da, cuya secuencia establecida era Asn-Ala-Asp-Phe-Gly-Leu-Asn-Gly-Leu-Glu-Gly-Leu-Ala, y otro 747 Da, con la secuencia Asn-Gly-Leu-Glu-Gly-leu-Lys, ambos inhibieron la oxidación del ácido linoléico, y se detectó que esta actividad fue muy similar a la presentada por un antioxidante sintético (BHT) (Rajapakse *et al.*, 2005). En estudios llevados a cabo en la péptidos producidos a partir de la piel de calamar, se observó que la presencia de residuos de leucina en el péptido (Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Ser) favorece la actividad

biológica (Aleman *et al.*, 2011) y que la ausencia de histidina pudiese ser la razón de que dichos péptidos no presenten actividad quelante (Mendis *et al.*, 2005).

En cuanto al mecanismo de cómo los péptidos obtenidos de la hidrólisis de proteínas de los subproductos de calamar actúan como agentes biológicos, en términos generales se considera que es mediante el secuestro de radicales libres (Mendis *et al.*, 2005; Nam *et al.*, 2008). Dicho mecanismo se atribuye a la presencia de algunos aminoácidos dentro de estos péptidos, como la hidroxiprolina e histidina, que pueden ser capaces de donar iones H para estabilizar las radicales libres. Sin embargo, es necesaria la presencia de otros aminoácidos que forman parte de la secuencia para estabilizar el radical formado y proveer esa propiedad antioxidante (Samaranayaka y Li-Chan, 2011), dentro de estos aminoácidos están la histidina, triptófano, lisina, metionina y prolina (Mendis *et al.*, 2005).

Conclusión

Los subproductos de organismos marinos, tales como el calamar, constituyen una importante fuente de contaminación del medioambiente, a menos que se realicen esfuerzos para su recuperación a través de la extracción de componentes valiosos. Dentro de los compuestos que pueden ser extraídos son las proteínas, las cuáles se pueden hidrolizar. Derivado de las propiedades biológicas que los hidrolizados proteícos del calamar, como son la alta actividad antioxidante, estos productos poseen alto potencial para ser empleados en diferentes industrias como la alimentaria, médica, agroquímica, farmacéutica o el cultivo de organismos marinos. En organismos en cultivo como los camarones los hidrolizados influyen en el desarrollo de los mismos. Antes de que la opción del uso de hidrolizados en la industria

acuícola se convierta en una realidad factible, todavía hay cuestiones prácticas y comerciales que estudiar y resolver. Algunos aspectos que deben tenerse en cuenta es que las condiciones de proceso influyen sobre las características estructurales de las moléculas que se están produciendo después de aplicar una determinada tecnología de hidrólisis, ya que éstas influyen grandemente en la respuesta que los organismos en cultivo. Por lo tanto, se requieren más investigaciones sobre el mecanismo de acción y mayores estudios *in vivo*. Así mismo es necesario realizar trabajos para la producción de estos compuestos a mayor escala. Con esto en mente se sugiere que el empleo de técnicas como el FTIR, RMN y la proteómica son herramientas útiles que permitirían ahondar en el conocimiento de los compuestos promotores del crecimiento que estén presentes en insumos ya empleados o que se estén planeando aplicar en el cultivo de organismos, para así establecer la mejor estrategia de manejo y de utilización.

Referencias

- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymatic hydrolysis of food proteins*. New York: Elsevier Applied Science Publishers.
- Aksnes, A., Hope, B., and Jönsson, E., Björnsson B.T., y Albrektsen, S. (2006). Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization. *Aquaculture* 261, 305-307
- Alaiz, M., Navarro, J.L., Giron, J., y Vioque, E. (1992). Amino-acid-analysis by high performance liquid-chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography* 591, 181-186.
- Alemán, A., Pérez-Santin, E., Bordenave-Jurchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillen, M.C. y Montero, P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International* 44, 1044-1051.
- Arias-Moscós J.L., Maldonado-Arce, A., Rouzaud-Sáñez, O., Márquez-Ríos, E., Torres-Arreola, W., Santacruz-Ortega, H., Gaxiola-Cortés, M.G. y Ezquerro-Brauer J.M. (2015a). Physicochemical characterization of protein hydrolysates produced by autolysis of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) byproducts. *Food Biophysics* 1, 145-154.
- Arias-Moscós, J.L., Ezquerro-Brauer, M., Martínez-Córdova, L.R., Martínez-Porchas, M. y Moreno-Arías, A. (2015b). Inclusion of two differently pH-autolysis hydrolysates of squid coproducts in diets of shrimp cultured under indoor and outdoor conditions. *Aquaculture Nutrition* 21, 750-754
- Arvanitoyannis, I.S y Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science and Technology* 43, 726-745.
- Aubourg S.P., Torres-Arreola W., Trigo M y Ezquerro-Brauer J.M. (2016). Partial characterization of jumbo squid skin pigment extract and its antioxidant potential in a marine oil system. *European Journal of Lipid Science and Technology* 118, 1293-1304.
- Carbajal, E.O.G. (1987). La alimentación de los peces cultivados en la región Andina del Perú. En: *Subdirección de Pesca Continental DdPdS. Ministerio de Pesquería*. Lima, Perú.

- Chan-Higuera, J.E, Robles-Sánchez, R.M. , Burgos-Hernández, A., Márquez-Ríos, E y Ezquerria-Brauer J.M. (2015). Squid by-products gelatines: Effect on oxidative stress biomarkers in healthy rats. *Czech Journal of Food Sciences* 34, 105-110.
- Córdova-Murueta, J.H. y García-Carreño, F.L. (2002). Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* 210, 371-384.
- Cruz, E. y Guillaume, J.C. (1983). Facteur de croissance de la farine de calmar pour la crevette japonaise:localisation de ce facteur. *CIEM Comité Mariculture F14 Copenhague* 13pp
- Cruz-Suarez LE, Guillaume J y Van Wormhoudt A. (1987). Effect of various levels of squid protein on growth and some biochemical parameters of *Penaeus japonicus* juveniles *Nippon Suisan Gakkaishi* 51, 2083 - 2088.
- Cuevas-Acuña D.A., Robles-Sánchez R.M., Torres-Arreola W., Márquez-Ríos E. y Ezquerria-Brauer J.M. (2015). Collagen from jumbo squid fins: Extracting conditions and influence of the protease system on collagen hydrolysate antioxidant activity. *CyTA-Journal of Food* 14,193-199.
- Ezquerria-Brauer, J.M. y Aubourg, S.P. (2019). Recent trends for the employment of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) by-products as a source of bioactive compounds with nutritional, functional and preservative applications: a review. *International Journal of Food Science & Technology* 54, 987-998.
- FAO. (2017). Yearbook of Fishery Statistics in Department FaA. Ed: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- González-Félix, M. L., Perez-Velazquez, M., Ezquerria-Brauer, J. M., Bringas-Alvarado, L., Sánchez-Sánchez, A. y Torres-Arreola, W. (2014). Evaluation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) byproduct hydrolysates obtained by acid-enzymatic hydrolysis and by autohydrolysis in practical diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Science and Technology (Campinas)* 34, 552-558.
- Guerette, P.A., Hoon, S., Ding, D., Amini, S., Masic, A., Ravi, V., Venkatesh, B., Weaver, J.C. y Miserez, A. (2014). Nanoconfined β -sheets mechanically reinforce the supra-biomolecular network of robust squid Sucker Ring Teeth. *ACS Nano* 8, 7170-9.
- Kotzamanis, Y.P., Alexis, M.N., Andriopoulou, A., Castritsi-cathariou, I. y Fortis, G. (2001). Utilization of waste material resulting from trout processing in gillhead bream (*Sparus aurata* L) diets. *Aquaculture Research* 32, 288-295.

- Lee, C.M. y Lian, P.Z. (2010). *Bioproduction of hydrolysates from squid processing products for aquaculture feed ingredient and organic fertilizer*. Page 9. United States: The Board of Governors for Higher Education.
- Lian, P. Z., Lee, C. M. y Park, E. (2005). Characterization of squid-processing byproduct hydrolysate and its potential as aquaculture feed ingredient. *Journal Agriculture and Food Chemistry* 53, 5587-5592.
- Lin, L. y Ba-fang, L. (2006). Radical scavenging properties of protein hydrolysates from jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichitti* Steenstrup) skin gelatin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 2290-2295.
- Lin, L. y Li, B.F. (2006). Radical scavenging properties of protein hydrolysates from jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichitti* Steenstrup) skin gelatin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 2290-2295.
- Liu, B.-L. y Chiang, P.-S. (2007). Production of hydrolysate with antioxidative activity and functional properties by enzymatic hydrolysis of defatted sesame (*Sesamum indicum* L.). *International Journal of Applied Science and Engineering* 6, 73-83.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H.G. y Kim, S.K. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences* 77, 2166-2178.
- Nam, K.A., You, S.G. y Kim, S.M. (2008). Molecular and physical characteristics of squid (*Todarodes pacificus*) skin collagens and biological properties of their enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Science* 73, C249-C255.
- Panyam, H. y Kilara, A.(2009). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science & Technology* 7, 120-125.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G. y Kim, S.K. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 562-569.
- Sánchez-Alonso, I., Careche, M. y Borderías, A.J. (2007). Method for producing a functional protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle. *Food Chemistry* 100, 48-54.

- Sánchez-Sánchez, A., Arias-Moscato, J.L., Cárdenas-López J.L., Márquez-Ríos E., García-Sánchez G. y Ezquerro-Brauer, J.M. (2014). Characterization of hydrolysates from jumbo squid by-products obtained by auto-hydrolysis and chemical-enzymatic process. *CyTA- Journal of Food* 12, 85-96.
- Sarabia-Sainz, H.M., Torres-Arreola, W., Márquez-Ríos, E., Santacruz-Ortega, H.C., Rouzaud-Sáñez, O., Valenzuela-Soto, E.M., Burgara-Estrella, A.J. y Ezquerro-Brauer, J.M. (2017). Interrelation of collagen chemical structure and nanostructure with firmness of three body regions of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *Food Biophysics* 12, 491-499.
- Sikorski, Z.E. y Kolodziejka, I. (1986). The composition and properties of squid meat. *Food Chemistry* 20, 213-224.
- Suárez-Jiménez G.M., Robles-Sánchez R.M., Yépiz-Plascencia G., Burgos-Hernández A. y Ezquerro-Brauer J.M. (2015a). *In vitro* antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities of collagen hydrolysates of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) byproducts. *Food Science and Technology* 35, 421-427
- Suárez-Jiménez G.M., Burgos-Hernández A., Torres-Arreola W., López-Saiz C.M., Velázquez Contreras C.A. y Ezquerro-Brauer, J.M. (2019). Bioactive peptides from collagen hydrolysates from squid (*Dosidicus gigas*) by-products fractionated by ultrafiltration. *International Journal of Food Science & Technology* 54, 1054-1061.
- Uriarte-Monotya, M.H, Santa-Cruz, H., Cinco-Moroyoqui, F.J., Rouzaud-Sáñez, O., Plascencia-Jatomea, M. y Ezquerro-Brauer, J.M. (2011). Giant squid gelatin: Chemical composition and biophysical characterization. *Food Research International* 44, 3243-3249.
- Vioque, J., Pedroche, J., del Mar Yust, M., Millán, F. y Clemente, A. (2001). Obtención y aplicación de hidrolizados protéicos. *Grasas y Aceites* 52, 132-136.
- Wüthrich, K. (2003). NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition* 42, 3340-3363.

Avances en el uso de Macroalgas Marinas Colectadas en Sonora, México, para el Control de Enfermedades Virales y Bacterianas en Camarón

Rivas-Vega¹, Martha Elisa, Miranda-Baeza¹, Anselmo, Osuna-Amarillas¹, Pablo Sergio y Nieves-Soto², Mario.

¹Universidad Estatal de Sonora (UES), Carretera a Huatabampo, Km5. Navojoa, Sonora, 85875, México. ²Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa, Blvd. Miguel Tamayo Espinoza de Los Monteros. Desarrollo Urbano 3 Ríos C.P. 80050, Culiacán de Rosales, Sinaloa, 80050, México. Correspondencia: Martha Elisa Rivas Vega. Universidad Estatal de Sonora (UES), Navojoa, Sonora 85875, México

Correo electrónico: martha.rivas@ues.mx

Resumen

En el presente documento, se describen algunos avances obtenidos en el estudio de tres macroalgas marinas colectadas en el sur de Sonora, México, identificando algunos compuestos con actividad biológica, así como su efecto en la supervivencia y respuesta inmune en camarones infectados con el virus de la mancha blanca (WSSV) o *V. parahaemolyticus*. En el extracto metanólico de *Gracilaria vermiculophylla* se encontró ácido ferúlico en mayor cantidad, seguido por resveratrol, ácido cumárico y catequina; así mismo, se logró separar una fracción activa del extracto cuya naturaleza del componente activo corresponde a la estructura de los terpenos. Además se encontró un efecto positivo en la sobrevivencia y en la respuesta inmune al ser infectados con *Vibrio parahaemolyticus* o con WSSV. El extracto metanólico de *Caulerpa sertularioides* presentó una mortalidad acumulada significativamente menor que el control infectado sin macroalga, en presencia de *V. parahaemolyticus*. El perfil fitoquímico del extracto metanólico de *C. sertularioides*, indicó la presencia de flavonoides, alcaloides y cumarinas. Se cuantificó la actividad antioxidante, encontrando 28.97 ± 0.24 de fenoles totales (mMeq AG/mg muestra) y 1.01 ± 0.06 de actividad antioxidante determinada por DPPH (mMeq TROLOX/mg muestra). *Ulva lactuca*, usada en extracto metanólico o bien, en co-cultivo mejoró la sobrevivencia de *L. vannamei* cuando fue infectado con WSSV o con *V. parahaemolyticus*.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, respuesta inmune, síndrome del virus de la mancha blanca, *Vibrio parahaemolyticus*.

I. Introducción

La acuicultura sigue creciendo a mayor velocidad que otros sectores de producción de alimento. El impacto social y económico, sigue aumentando mediante la contribución a los medios de subsistencia y la generación de ingresos. Sin embargo, cuando es mal administrada puede afectar la estabilidad de los ecosistemas, que se reflejan en trastornos ambientales y repercuten negativamente en aspectos sociales y económicos (FAO, 2018). La acuicultura es una de las actividades con mayor potencial y desarrollo en los últimos años en México. Aporta beneficios sociales y económicos, además de ser una fuente de alimento con un elevado valor nutricional y costos accesibles (Álvarez *et al.*, 2012). A medida que la intensificación en los cultivos incrementa, las enfermedades infecciosas dentro de los cultivos han sido más frecuentes, generando pérdidas económicas importantes. En los cultivos de camarón, las más agresivas son de origen viral y bacteriano, ya que han causado mortalidades elevadas (Varela *et al.*, 2014). Se han registrado alrededor de 20 virus que afectan a los cultivos de camarón (Lightner *et al.*, 1998), entre de los que destacan el, *Baculovirus penaei*, Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHN) (Gómez *et al.*, 2001) y el Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV); este último es el de mayor realce a nivel nacional. En cuanto a las enfermedades de origen bacteriano, se tiene que, las cepas patógenas del género *Vibrio* pueden causar mortalidades severas como el caso del síndrome de la muerte temprana o síndrome de la necrosis hepatopaneocrática aguda, que es causada por una cepa patógena de *Vibrio parahaemolyticus* (Lightner *et al.*, 2014). Actualmente se realizan diversas investigaciones sobre diversas alternativas para proponer soluciones o modelos de prevención contra el ataque de dicho microorganismo. Al respecto las algas marinas, recientemente han recibido gran atención, por ser fuentes potenciales de metabolitos secundarios con un amplio espectro de actividades biológicas, incluyendo propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales y antioxidantes (Zhang *et al.*, 2010). Existen algunos estudios donde se han aislado diversos compuestos bioactivos de macroalgas marinas con propiedades antimicrobianas, biomoduladoras, antioxidantes y como estimuladoras del crecimiento (Paniagua-Michel *et al.*, 2009; Cen-Pacheco *et al.*, 2010; Guven *et al.*, 2010; Pallela *et al.*, 2010).

En el presente documento, se describen algunos avances obtenidos en el estudio de tres macroalgas marinas colectadas en el sur de Sonora, México, identificando algunos compuestos con actividad biológica, así como su efecto en la supervivencia y respuesta inmune en camarones infectados con el virus de la mancha blanca (WSSV) o *V. parahaemolyticus*.

II. Enfermedades del camarón

Las bacterias del género *Vibrio* que se han identificado como las principales causantes de severas enfermedades en camarón son: *V. harveyi* (Liu-Chung *et al.*, 1996), *V. damsela* (Song-Ling y Lee, 1993), *V. alginolyticus* (Lee-Kau *et al.*, 1996) y *V. parahaemolyticus* (Sung-Hung *et al.*, 1999). Además, en México, diversos virus han provocado pérdidas económicas importantes en las empresas, entre los más importantes se encuentran: *Baculovirus penaei* en 1998, infección hipodérmica y necrosis hematopoyética (IHHNV) entre 1989 y 1990, síndrome del Taura (TSV) a partir de 1995, más recientemente la enfermedad de la cabeza amarilla (YHV) (De la Rosa-Vélez, 2001) y síndrome de la mancha blanca. El virus de la mancha blanca o WSSV, es hasta el momento la más devastadora enfermedad reportada para camarones peneidos cultivados (Ligtner, 1996; Flegel, 1997).

La enfermedad más recientemente detectada en los cultivos de camarón es el síndrome de la muerte temprana o síndrome de la necrosis hepatopancreática que por sus siglas en inglés, conocida como EMS y AHPNS, respectivamente. Los primeros brotes de esta enfermedad se registraron en 2009, en granjas de China, seguida por la isla de Hainan en 2010, después en Vietnam, Malasia y Tailandia (Flegel, 2012; Zorriehzahra y Banaederakhshan, 2015). En México se detectó por primera vez en el 2013, el primer brote ocurrió en Nayarit, seguido por Sonora y Sinaloa, estos eventos se registraron por primera vez en los tanques de postlarvas (Nunan *et al.*, 2014). Esta enfermedad ha sido reportada en *P. monodon*, *L. vannamei* y *P. chinensis*. El patógeno responsable es *Vibrio parahaemolyticus*, el cual es una bacteria Gram (-), es un habitante común de los ambientes costeros y estuarinos de todo el mundo. Esta bacteria al ser infectada por un fago genera una potente toxina. De ahí que a menudo se encuentra naturalmente asociada con los sistemas de acuicultura de camarón.

Rivas-Vega, Martha Elisa, Miranda-Baeza, Anselmo, Osuna-Amarillas, Pablo Sergio y Nieves-Soto, Mario. 2019. Avances en el uso de Macroalgas Marinas Colectadas en Sonora, México, para el Control de Enfermedades Virales y Bacterianas en Camarón. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 333-347.

Ciertas condiciones ambientales pueden ser más favorables para el establecimiento, la supervivencia y el crecimiento de esta bacteria, tales como la temperatura, la salinidad, el zooplancton, el lavado de las mareas y el oxígeno disuelto (FAO, 2013). La infección de *V. parahaemolyticus*, se da por vía oral. La bacteria puede estar mezclada en los detritus que están en el fondo del estanque o flotando en la columna de agua y a través del consumo de tejido infectado. La infección comienza con la colonización del tracto digestivo, donde produce toxinas y causa, en la fase aguda, una disfunción de las células del hepatopáncreas (HP), en donde se destruyen las células embrionales (E), Reabsorbentes (R), fibrilares (F) y tipo vesícula (B), y además producen el desprendimiento de las células epiteliales tubulares, inflamación hemocítica y necrosis muy marcada del HP. En la fase terminal, adicional al desprendimiento de las células epiteliales, se presenta una infección secundaria bacteriana masiva (Cuellar-Anjel, 2014; Zorriehzahra y Banaederakhshan, 2015). El primer paso para prevenir la propagación de una enfermedad recientemente reconocida, es identificar el agente causal (Nunan *et al.*, 2014). Seguido por el cumplimiento del protocolo de sanidad establecido, ya que se ha comprobado con otras enfermedades como WSSV, que el seguimiento de estas prácticas ayuda a disminuir la presencia de patógenos específicos (Flegel, 2012). Otra medida que se ha considerado necesaria, como lo describen Cuellar-Ángel *et al.* (2014), es el uso de antibióticos efectivos contra *Vibrio parahaemolyticus*, en los cuales se incluyen oxitetraciclina, flofenicol, enroflocina, romet 30, entre otros. Sin embargo, el uso de antibióticos puede generar algunos problemas de salud pública (efecto residual), así como generar bacterias resistentes a estos químicos. Por otro lado, con el uso de antibióticos, se incrementa la posibilidad de eliminar bacterias benéficas en los tanques de cultivo, las cuales potencialmente pueden ayudar en el control de *V. parahaemolyticus*. Los retos a futuro para mitigar el síndrome de la muerte temprana, serán: mejorar la epidemiología, diagnóstico, patogenicidad y virulencia, infecciones mixtas, medidas de control no antimicrobianas, medio ambiente, tecnologías de policultivo. Por este motivo es necesario aplicar las buenas prácticas en las granjas, laboratorios y plantas de procesamiento de camarón. Por otro lado, se debe tener mayor vigilancia y control en las importaciones y exportaciones de camarón. Adicionalmente se deben aplicar alternativas amigables con los organismos y con el ambiente. Esto permitirá minimizar el daño económico en las empresas

productoras, mantendrá los mercados abiertos y no afectará la salud de los consumidores finales (FAO, 2013). Para mitigar las altas tasas de mortalidad, se requiere contar con productos naturales que permitan cultivar organismos sanos, capaces de responder de manera favorable ante agentes infecciosos como bacterias y virus. Los compuestos bioactivos pueden ser una alternativa viable. Los productos marinos se consideran una gran fuente de compuestos bioactivos (Blunden, 2001; Layse *et al.*, 2011).

III. Avances en el uso de macroalgas marinas para el control de enfermedades del camarón.

III.1. Avances con *Gracilaria vermiculophylla*

Mendivil-Morales (2018) identificó compuestos bioactivos en *G. vermiculophylla* (Tabla 1). El ácido ferúlico se encontró en mayor cantidad, el cual fue superior a la encontrada en la macroalga roja *Chondrus crispus* reportada por Farvin *et al.*, 2013, quienes reportaron 0.1 mg/g de extracto; los mismos investigadores encontraron 0.2 mg/g de extracto de ácido cumárico en la macroalga verde *Ulva lactuca*, cantidad inferior a la cuantificada en *G. vermiculophylla*; también reportaron 4.1 mg/g de ácido p-hidroxi en *G. vermiculophylla* la cual fue cuantificada en extracto con agua y fue muy superior a la que se obtuvo con *G. vermiculophylla* colectada en Sonora, México, no obstante en el extracto etanólico se encontró ausente el ácido p-hidroxi. Cabe mencionar que la polaridad del solvente utilizado durante el proceso de extracción influye significativamente en el tipo y abundancia de los compuestos que son extraídos. Por ejemplo, en el estudio de Farvin *et al.* (2013) se analizaron dieciséis especies de macroalgas incluidas rojas, café y verdes, usando dos solventes, agua y etanol; los investigadores obtuvieron mayor concentración de ácidos fenólicos en los extractos etanólicos, pero mayor diversidad de ácidos fenólicos en los extractos con agua, la tendencia fue la misma en todas las especies estudiadas.

Tabla 1. Compuestos bioactivos en *Gracilaria vermiculophylla* (mg/g muestra seca).

Ácido p-hidroxi	Catequina	Ácido cumárico	Ácido ferúlico	Resveratrol
0.45±0.04	1.38±0.26	1.41±0.03	4.50±0.75	2.75±0.03

(Mendivil-Morales, 2018)

En otro estudio con algas colectadas en el sur de Sonora, Hernández-Alegría (2019), evaluó la actividad inhibitoria *in vitro* de un extracto metanólico crudo de la macroalga *G. vermiculophylla*, del cual se obtuvieron cinco fracciones por medio de cromatografía en columna, a cada una de las fracciones se les determinó el perfil fitoquímico, así como la actividad antimicrobiana *in vitro* con *V. parahaemolyticus*. Una vez identificada la fracción más activa, se obtuvieron cuatro subfracciones, las cuales fueron analizadas por resonancia magnética nuclear (RMN) para identificar los compuestos bioactivos. El extracto metanólico crudo de *G. vermiculophylla* tuvo un rendimiento de extracción de 8.7 g de extracto/100g de harina seca. El extracto crudo y la fracción 3 presentaron una MIC₅₀ de 1400 µg/mL. Los resultados del análisis de RMN indican que dentro del espectro de la subfracción 4 de la fracción 3, existen señales características de los compuestos terpenos, que sumado al resultado de las pruebas fitoquímicas indicó la presencia de compuestos de tipo terpeno.

Diferentes estudios han demostrado la actividad de las macroalgas contra microorganismos y se han logrado identificar el tipo de metabolitos secundarios presentes en los extractos de las macroalgas que son responsables de esta actividad. Cyriac y Eswaran (2015) publicaron un estudio en donde identificaron por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) 13 compuestos bioactivos del extracto metanólico de *Gracilaria dura*, la mayoría fueron de tipo ácido graso como ácido oleico, ácido palmitoleico y el ácido 9-octadecanoico; también se identificaron dos compuestos de tipo terpeno, fitol y escualeno, los cuales ya se han reportado como compuestos con actividad antibacteriana, antioxidante y antitumoral. Anaya-Rosas y colaboradores en el 2019, evaluaron a *G. vermiculophylla* en co-cultivo con *L. vannamei*, y su efecto en la supervivencia y respuesta inmune después de la infección con *V. parahaemolyticus* y el virus de la mancha blanca (WWSV). Encontrando que la supervivencia del camarón en co-cultivo con la macroalga,

Rivas-Vega, Martha Elisa, Miranda-Baeza, Anselmo, Osuna-Amarillas, Pablo Sergio y Nieves-Soto, Mario. 2019. Avances en el uso de Macroalgas Marinas Colectadas en Sonora, México, para el Control de Enfermedades Virales y Bacterianas en Camarón. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 333-347.

mejoró significativamente, comparada con el control infectado con el virus de la mancha blanca; en otro ensayo los organismos fueron infectados con *V. parahaemolyticus* y los resultados similares. El conteo total de hemocitos y la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, se incrementaron significativamente después de la infección con WSSV y *V. parahaemolyticus*. Félix-Muñoz (2018) evaluó el efecto del extracto metanólico crudo de *G. vermiculophylla* en la supervivencia de *L. vannamei* infectado con el virus de la mancha blanca. Utilizó dos dosis: 150 y 300 mg/L, la aplicación fue por inmersión, y los resultados obtenidos se presentan en la figura 1.

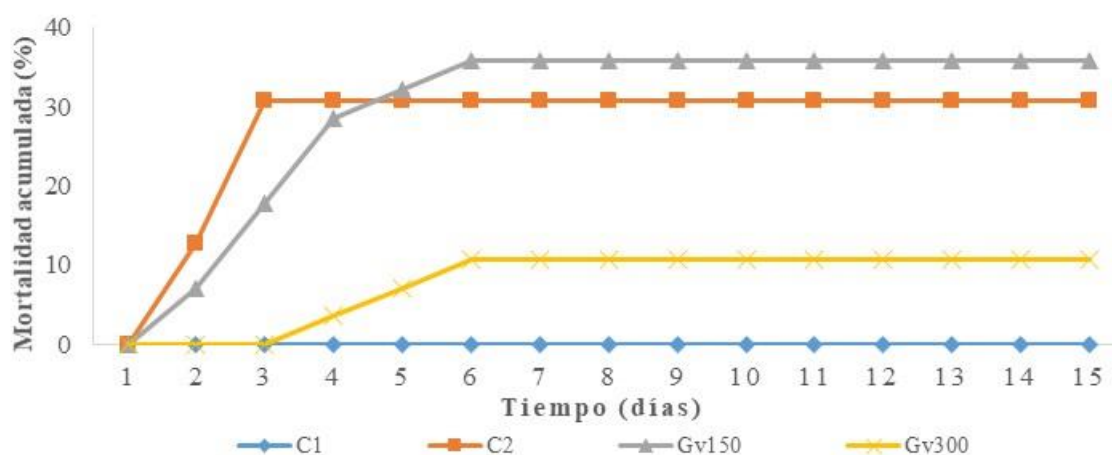


Figura 1. Mortalidad acumulada de juveniles de *L. vannamei* en presencia del virus de la mancha blanca y con extractos metanólicos de *G. vermiculophylla* (C1 = Control sin infectar; C2 = Control infectado sin extracto; Gv150 = Tratamiento con 150mg/L de extracto metanólico de *G. vermiculophylla*; Gv300 = Tratamiento con 300mg/L de extracto metanólico de *G. vermiculophylla*). Fuente: Félix-Muñoz (2018).

Diversos estudios han demostrado que uno de los beneficios del uso de las macroalgas como alimento en el cultivo de camarón, es la mejora en la respuesta inmune y una mayor actividad enzimática en repuesta al estrés oxidativo, ocasionado por la presencia de organismos patógenos. Esto se debe a la incorporación de compuestos bioactivos, principalmente polisacáridos sulfatados, compuestos fenólicos y antioxidantes. Estudios indican que el uso

de estos compuestos tiene actividad antimicrobiana en *L. vannamei* y *P. monodon* (Chotigeat *et al.*, 2004; Selvin *et al.*, 2011; Layse *et al.*, 2011; Rebecca *et al.*, 2012; Esquer-Miranda *et al.*, 2016), y han mejorado la respuesta inmune y la supervivencia, con respecto a los organismos testigo.

IV.2 Avances con *Ulva lactuca*

Esquer-Miranda y colaboradores (2016) evaluaron el efecto de extractos metanólicos de *U. lactuca* en la sobrevivencia de *L. vannamei* infectado con *V. parahaemolyticus*, los cuales fueron expuestos a dos dosis del extracto de *U. lactuca*. Los organismos tratados con *U. lactuca* a una dosis de 300 mg/L, presentaron menor mortalidad (80%) con respecto al tratamiento infectado y sin macroalga. Immanuel y colaboradores (2004) encontraron una disminución en la mortalidad de *P. indicus* infectado con *V. parahaemolyticus* aplicando un extracto butanólico de *Ulva lactuca* (utilizando artemia enriquecida con 400 mg/L de extracto). Sus resultados coinciden con lo encontrado en el presente estudio; a pesar de que en el trabajo mencionado se utilizó un solvente con menor polaridad que el metanol. La evidencia indica que la supervivencia de los camarones infectados se debió a los compuestos bioactivos extraídos de *U. lactuca*.

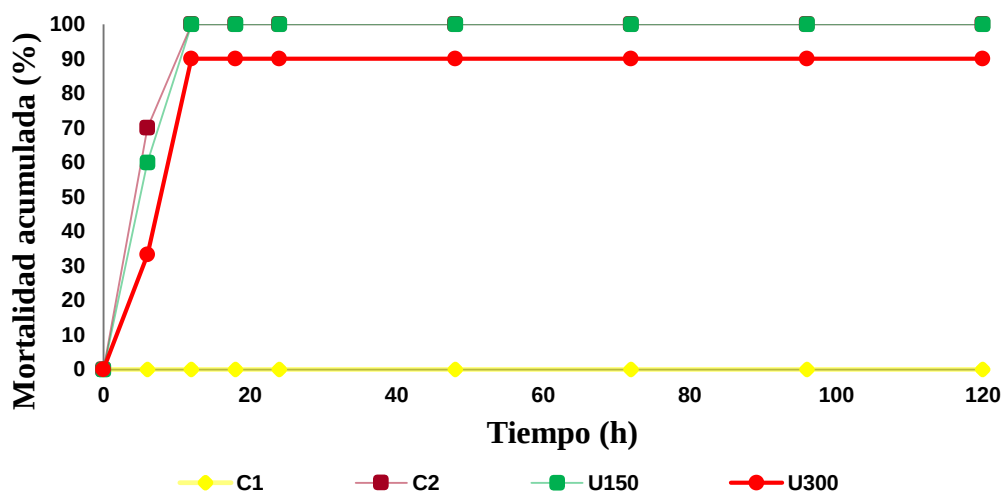


Figura 2. Mortalidad acumulada (%) de *L. vannamei* infectados de *V. parahaemolyticus*, después de la inmersión en extractos metanólicos de *Ulva lactuca* (U) a dos

concentraciones: 150 y 300 mg/L, además de un control sin infección (C1) y un control infectado (C2), durante 120 horas postinfección. Fuente: Esquer-Miranda *et al.*, 2016.

El género *Ulva* se ha relacionado con un alto contenido de fenoles totales. *Ulva rigida* presentó 160 mg de equivalentes de GAE/100 g (Chernane *et al.*, 2014), mientras que *U. lactuca* mostró 470 mg de equivalentes de GAE/100 g (El-Baky *et al.*, 2008), similar a lo encontrado en el presente trabajo donde se determinó un total de 24.03 ± 0.41 de Fenoles totales (mMeq AG/mg muestra) y 4.22 ± 0.20 de actividad antioxidante por DPPH (mMeq TROLOX/mg muestra), esto probablemente a que las condiciones ambientales entre los lugares de extracción son similares (Khairy y El-Shika, 2015; Massoumeh *et al.*, 2013; Trigui *et al.*, 2013).

IV.3 Avances con *Caulerpa sertularioides*

Esquer-Miranda y colaboradores en el 2016, evaluaron el efecto de extractos metanólicos de *C. sertularioides* colectada en el Sur de Sonora, en la supervivencia y respuesta inmune de *L. vannamei* infectado con *V. parahaemolyticus*. Encontrando que la inhibición *in vitro* de la bacteria ocurrió con una concentración mínima inhibitoria (MIC₉₀) de 1500 µg/mL, esta cantidad se considera alta, si se compara con las encontradas en plantas terrestres, donde la actividad se ha determinado en 100 µg/mL (Pretto *et al.*, 2004). En la figura 3, se muestran los resultados obtenidos después de infectar a *L. vannamei* con *V. parahaemolyticus*, los cuales fueron expuestos a dos dosis del extracto metanólico de *C. sertularioides* (Esquer-Miranda *et al.*, 2016). Se observa que el tratamiento con 300 mg/L de extracto metanólico aplicado por inmersión presentó una mortalidad acumulada del 70%, significativamente menor a la que presentaron los tratamientos sin macroalga y con 150 mg/L de extracto metanólico. El perfil fitoquímico del extracto metanólico de *C. sertularioides*, indicó la presencia de flavonoides, alcaloides y cumarinas. Se cuantificó la actividad antioxidante, encontrando 28.97 ± 0.24 de fenoles totales (mMeq AG/mg muestra) y 1.01 ± 0.06 actividad antioxidante por DPPH (mMeq TROLOX/mg muestra) (Esquer-Miranda, 2018).

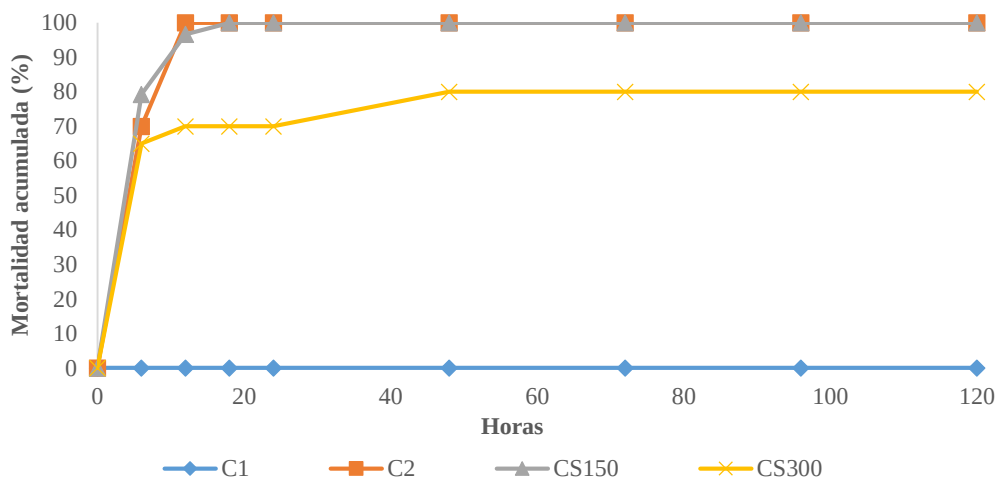


Figura 3. Mortalidad acumulada (%) de *L. vannamei* infectado con *V. parahaemolyticus*, después de la inmersión en extractos metanólicos de *Caulerpa sertularioides* a dos concentraciones: 150 y 300 mg/L, además de un control sin infección (C1) y un control infectado (C2), durante 120 horas postinfección. Fuente: Esquer-Miranda *et al.* (2016).

Las macroalgas también son ricas en compuestos fenólicos, los cuales tienen propiedades antioxidantes, su presencia se ha reportado en algas rojas (Ghannadi *et al.*, 2016) cafés (Sánchez-Machado *et al.*, 2002) y verdes (Panayotova *et al.*, 2013). En un estudio donde se evaluó el contenido de fenoles totales (provenientes de extractos metanólicos) se cuantificaron 96.5 mg de equivalentes de GAE. 100 g⁻¹ de harina de *Caulerpa racemosa* (Chew *et al.*, 2008). Así también, en el estudio realizado con *Caulerpa lentillifera* se obtuvieron 130 mg de equivalentes de GAE·100 g⁻¹ de harina (Tang-Nguyen *et al.*, 2011), estos resultados son inferiores a los obtenidos en el presente estudio con *C. sertularioides* (409 mg de equivalentes de GAE·100 mL⁻¹). Las diferencias en el contenido de compuestos bioactivos, para las mismas especies colectadas en distintos periodos de tiempo o distintas ubicaciones, se deben probablemente a las variables presentes en cada estación del año (Khairy y El-Shika, 2015) y en cada zona geográfica (Massoumeh *et al.*, 2013).

IV. Conclusiones

Gracilaria vermiculophylla en co-cultivo o por inmersión en *L. vannamei* mejora la respuesta inmune y la sobrevivencia en presencia de WSSV o *V. parahaemolyticus*.

El extracto metanólico de *G. vermiculophylla* contiene ácido ferúlico, resveratrol, ácido cumárico y catequina.

Los extractos metanólicos de *C. sertularioides* y *U. lactuca* aplicados por inmersión a una concentración de 150 y 300 mg/L, respectivamente, a juveniles de *L. vannamei* en presencia de *V. parahaemolyticus*, mejoraron significativamente la supervivencia.

Las tres macroalgas marinas colectadas en el sur de sonora, presentan un alto potencial para ser utilizadas en el control de enfermedades de *L. vannamei*.

V. Literatura citada

- Álvarez, T.P., F. Soto., Q.S. Avilés., L.C. Díaz., C.L. Treviño. 2012. Panorama de la investigación y su repercusión sobre la producción Acuícola en México. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca -Instituto Nacional de la Pesca. 30 pp.
- Anaya-Rosas, R.E., Rivas-Vega, M.E., Miranda-Baeza, A., Pinna-Valdez, P., Nieves-Soto, M. 2019. Effects of a co-culture of marine algae and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on the growth, survival and immune response of shrimp infected with *Vibrio parahaemolyticus* and white spot virus (WSSV). Fish and Shellfish immunology. 87: 136-143.
- Blunden, G., 2001. Biologically active compounds from marine organisms. Phytotherapy Research, 15:89.
- Cen-Pacheco, F., Nordstrom, L., Souto, M. L., Martin, M. N., Fernandez, J. J. y Daranas, A. H. 2010. Studies on polyethers produced by red algae. Marine Drugs, 8, 1178-1188.
- Chernane H. Mansori M., Latique C. y El Kaoua M. 2014. Evaluation of antioxidant capacity of methanol extract and its solvent fractions obtained from four moroccan macro algae species. European Scientific Journal. 1857 – 7881.
- Chew, Y.L. y Lim, Y.Y. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. LWT-Food Science Technology, 41(6): 1067-1072
- Chotigeat W., S. Tongsupa, K. Supamataya y A. Phongdara. 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. Aquaculture; 233:23-30.
- Cuéllar-Anjel, J. 2013. Síndrome de mortalidad temprana (EMS). Enfermedad de la necrosis aguda de la hepatopáncreas (AHPND). Center of Food security and public health. 2-7.
- Cyriac B. y K. Eswaran. 2015. GC - MS determination of bioactive components of Gracilaria dura(C.Agardh) J. Agardh. Science Research Reporter 5: 100-105.
- De la Rosa-Vélez, J. 2001. Virus de la mancha blanca (WSSV) y cabeza amarilla (YHV), dos amenazas potenciales a los cultivos camaronícolas en México. Panorama acuícola 6:18-19.
- El-Baky H. H., El Baz F. K. y El Baroty G. S. 2008.Evaluation of Marine Alga *Ulva lactuca* as a Source of Natural Preservative Ingredient. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 3 (3): 434-444.
- Esquer-Miranda, E, M. Nieves-Soto, M.E. Rivas-Vega, A. Miranda-Baeza y P. Piña-Valdez. 2016. Effects of methanolic macroalgae extracts from *Caulerpa sertularioides* and *Ulva lactuca* on *Litopenaeus vannamei* in the presence of *Vibrio* bacteria. Fish Shellfish Immunol. 51: 346-350.
- Esquer-Miranda, E. 2018. Compuestos bioactivos de las macroalgas *Caulerpa sertularioides* y *Ulva latuca* y su aplicación en el control de enfermedades de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Sinaloa. 102 pp.

- FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome Italy. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Flegel TW. 1997. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) In Thailand. World J Microbiol Bio-technol. 13:433-42.
- Flegel, T.W. 2012. Historic emergence, impact and current of shrimp pathogens in Asia. Journal of invertebrate Pathology, 110: 166-173.
- Ghannadi, A., Shabani L., Yegdaneh A. 2016. Cytotoxic, antioxidant and phytochemical analysis of *Gracilaria* species from Persian Gulf. Adv Biomed Res 5: 139-142.
- Gómez-Gil, B., Roque, A. y Guerra, A. 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. En: PÁEZ-OSUNA, F. (Ed.). Camaronicultura y medio ambiente. México: Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, 273-274.
- Güven, K. C., Percot, A. y Sezik, E. 2010. Alkaloids in marine algae. Marine Drugs, 8, 269-284.
- Hernández-Alegría, A.S. 2019. Aislamiento y evaluación de compuestos bioactivos con actividad antibacteriana *in vitro* de extractos metanólicos de *Gracilaria vermiculophylla* contra *Vibrio parahaemolyticus*. Tesis de maestría. Universidad Estatal de Sonora. 52 pp.
- Immanuel, G., Vincibai, V.C., Sivaram, V., Palavesam, A. y Marian, M.P. 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. Aquaculture, 236 (1-4): 53-65.
- Khairy, H. M., El-Sheikh, M. A. 2015. Antioxidant activity and mineral composition of three Mediterranean common seaweeds from Abu-Qir Bay, Egypt. Saudi Journal of Biological Sciences, 22, 623–630.
- Layse C., Almeida, H., Falcão, G., Lima, C., Montenegro, N., Lira, P., Athayde-Filho, L., Rodrigues, M., Souza, J., Barbosa-Filho y Leônia M. 2011. Bioactividades de algas marinas del género *Gracilaria*. Department of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051-900, Brazil.
- Lee-Kau, K., Yu-Shiang, R., Chen, F.R., Yang T.I. y Liu-Ping, C. 1996. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. Curr Microbiol. 33: 229-232.
- Lightner D.V 2013. Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS/AHPNS). Videoconferencia de la Organización Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. OIRSA.
- Lightner DV. 1996. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. In: Special Publication of the World Aquaculture Society. LA: Baton Rouge.
- Lightner, D.V., Redman, R., Pantoja C., Noble, B. y Tran, L. 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. Global Aquacult Advocate Jan/Feb 2012:40
- Liu-Chung, P., Lee-Kau, K. y Chen, S.N. 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn *Penaeus monodon*. Left Appl Microbiol, 22:413-416.

- Massoumeh Farasat, Ramazan-Ali Khavari-Nejad, Seyed Mohammad Bagher Nabavi and Foroogh Namjooyan. 2013. Antioxidant properties of two Green seaweeds from Northern Coasts of Persian Gulf. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*:8(1); 47-52.
- Mendivil-Morales, M. 2018. Determinación De Compuestos Bioactivos Y Actividad Antioxidante De La Macroalga *Gracilaria vermiculophylla*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Durango. 102 pp.
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., Gomez-Jimenez, S. 2014. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis Aquat Org*, 111: 81-86.
- Pallela, R., Na-Young, Y., y Kim, S. K. 2010. Anti-photoaging and photoprotective compounds derived from marine organisms. *Marine Drugs*, 8, 1189-1202.
- Paniagua-Michel, J., Capa-Robles, W., Olmos-soto, J. y Gutierrez-Millán, L.E. 2009. The carotenogenesis pathways via the isoprenoid-beta-carotene interference approach in a new strain of *Dunaliella salina* isolated from Baja California México. *Marine Drugs*, 7, 45-56.
- Pretto, J. B., Cechinel-Filho, V., Noldin, V.F., Sartori, M.R., Isaias, D.E. and Bella-Cruz, A. 2004. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). *Z. Naturforsch*, 59 c, 657-662.
- Sánchez-Machado D. I., López-Hernández J., Paseiro-Losada P. 2002. High-performance liquid chromatographic determination of alpha-tocopherol in macroalgae. *J Chromatogra*, 976 (2):277-84.
- Selvin J., Manilal A., Sujith S., Seghal Kiran G., Premnath Lipton A. 2011. Efficacy of marine green alga *Ulva fasciata* extract on the management of shrimp bacterial diseases. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 39(2): 197-204.
- Song-Ling, Y. y Lee SP. 1993. Characterization of ecological implication of luminous *Vibrio Harveyi* isolated from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Bulletin Institute of Zoology Academia Sinical*, 32:217-220.
- Sung-Hung, H., Li, H.C., Tsai-Feng, M., Ting-Yuan Y. y Chao, W.L. 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivation and in the hepatopancreas of healthy and disease shrimp. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 236:261-271.
- Tang-Nguyen V, Jinn-Pyng Ueng, y Guo-Jane Tsai. 2011. Proximate Composition, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of Seagrape (*Caulerpa lentillifera*) *Journal of Food Science*, 76(7): 950-958
- Trigui M., Gasmi L., Zouari I., Tounsi S. 2013. Seasonal variation in phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of *Ulva rigida* (Chlorophyta) and assessment of antiacetylcholinesterase potential. *J Appl Phycol*, 25:319–328.
- Varela A. y Peña, N. 2014. El Virus del Síndrome de las Manchas Blancas (WSSV): una revisión y su impacto en la camaronicultura costarricense. *Revista Ciencias Veterinarias. Escuela de Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Costa Rica*. 28 (2): 51-69.

Zhang Z., Wang F, Wang X, Liu X, Hou Y, y Zhang Q. 2010. Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydr. Polym.*, 82: 118–121.

Cultivos Multitróficos con la Tecnología de Biofloc: Incrementando la Eficiencia del Uso de los Nutrientes de la Dieta

Eficiencia de Nitrógeno y Fósforo con IMTA en BFT

Esmeralda Chamorro Legarda, Felipe do Nascimento Vieira, Claudia Machado, Walter Quadros Seiffert

Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Camarões Marinhos. Servidão dos Coroas, 503, Barra da Lagoa, Florianópolis, SC. CEP 8061-600. E-mail: felipe.vieira@ufsc.br

Resumen

El sistema de biofloc al trabajar con altas densidades de cultivo y hacer el control de los niveles de amonio tóxico con el uso de las cadenas microbianas, es una alternativa sostenible para producción, una vez que disminuye el uso de agua. Sin embargo, la ausencia de renovación de agua genera un acumulado de sólidos suspendidos, nitrógeno y fósforo en el sistema, una vez que de estos dos últimos los camarones retienen solamente 30% y 11%, respectivamente. La incorporación de los principios de la Acuicultura Multitrófica Integrada (AMTI) en el sistema de biofloc puede auxiliar en la mitigación de este problema. Así, el objetivo de este trabajo es demostrar los beneficios de la aplicación de los conceptos de AMTI en la mejoría del uso de los nutrientes (N e P) en el cultivo del camarón blanco del Pacífico en sistema de biofloc. Serán abordados los resultados de cinco experimentos: 1) Acuaponia de camarón y salicornia, 2) cultivo integrado de camarones y tilapias, 3) cultivo AMTI de camarones, tilapias y salicornia; 4) cultivo integrado de camarones y lisas, 5) cultivo AMTI de camarones, lisas y *Ulva* sp. En el trabajo evaluando la acuaponia de camarones y salicornia, fue observado que la producción de biomasa de plantas fue el doble de la biomasa de camarón, incrementando la retención de nitrógeno en 25%. Ya en la integración de camarones y tilapia, se incrementó la productividad en 31,3%, resultando en una retención de nitrógeno y fósforo 27,9% y 223%, respectivamente. Con la incorporación de la salicornia en el sistema integrado de camarones y tilapias, resultó en 12% de incremento en la productividad, sin embargo, sin incrementar la retención de nitrógeno y fósforo. En el sistema integrado de camarones y lisas, la retención de fósforo fue 16,8% superior en el sistema con lisas. Similar, la incorporación de la *Ulva* sp. al sistema integrado de camarones y lisas resultó en el incremento de la retención de nitrógeno en 5,5% y de fósforo en 7,5% en relación con el sistema sin macroalgas (*Ulva* sp.). De este modo, queda demostrado que la utilización de los conceptos de AMTI al sistema de biofloc aumentan la eficiencia del uso de nitrógeno y fósforo de la dieta en el cultivo de camarón blanco del Pacífico en **sistema** de biofloc.

Palabras Clave: AMTI, BFT, *Litopenaeus vannamei*, *Oreochromis niloticus*, *Sarcocornia ambigua*, *Mugil* sp., *Ulva* sp.

1. Introducción

La acuicultura dentro del sector de comida animal es el sector que más crece, produciendo 111 millones de toneladas y alrededor de 249 millones de dólares en 2017 (FAO-FIGIS, 2019). La producción de camarón ha crecido constantemente en los últimos años, alcanzando una producción de 5,5 millones de toneladas en 2017 (FAO-FIGIS, 2019). La FAO proyecta que la acuicultura continúe creciendo rápidamente, debido a la intensificación de los sistemas de producción, la diversificación de especies y la introducción de nuevas tecnologías innovadoras para hacer que la producción sea más eficiente (FAO, 2018). La tecnología de biofloc (BFT, las siglas en inglés de *Biofloc Technology*) es una tecnología que contribuye a la intensificación de la producción. El sistema de BFT se ha usado en la producción del camarón blanco del pacífico (*Litopenaeus vannamei*) con altas densidades de siembra y mínima, o cero, renovación de agua, reduciendo considerablemente el área de cultivo usada para cultivo y también el recurso agua en comparación con un sistema semi-intensivo (Samocha *et al.*, 2012). Por ejemplo, es posible producir un kilogramo de camarón en solo 100 litros de agua en sistema de biofloc, mientras que en un sistema tradicional de cultivo se usa aproximadamente 64.000 litros para producir el mismo kilogramo de camarón (Otoshi *et al.*, 2007).

El sistema de BFT está basado en la formación de agregados microbianos que se inician por colonización bacteriana heterotrófica estimulada por la adición de una fuente externa de carbono (Avnimelech, 2015). La bacteria heterotrófica absorbe el nitrógeno inorgánico y el ortofosfato, tornándolo como biomasa celular y, consecuentemente, reduciendo los recambios de agua y aportando bioseguridad (McIntosh, 2000). Adicionalmente, los agregados microbianos pueden ser usados como una fuente de alimento por los propios animales cultivados (Xu *et al.*, 2012). Durante el cultivo las bacterias nitrificantes se establecen las bacterias nitrificantes en el sistema, estas bacterias oxidan el amonio para nitrito y el nitrito para nitrato (Ebeling *et al.*, 2006).

No obstante, la implementación del sistema de BFT puede enfrentar algunos obstáculos, especialmente la alta concentración de sólidos generados y altas concentraciones del nitrógeno y fósforo en el agua. La excesiva acumulación de sólidos suspendidos totales en el

agua pueden perjudicar el crecimiento del camarón y deben ser removidos del sistema (Schveitzer *et al.*, 2013). De la misma manera, estos sólidos son ricos en nitrógeno y fósforo. Los organismos de cultivo tienen una baja fijación de nutrientes en promedio solamente retienen entre el 25 y 27% del nitrógeno y entre 6 y 21% del fósforo proveniente de la dieta (Avnimelech, 2012; Crab *et al.*, 2007) y lo restante permanece en el agua en forma de efluentes.

En ese sentido, la utilización de un sistema multitrófico integrado (IMTA, por sus siglas en inglés Integrated Multi-Trophic Aquaculture) puede mejorar el desarrollo del camarón en biofloc. IMTA es un sistema el cual integra diferentes niveles tróficos en el mismo ambiente de cultivo, resultando en una conversión de los residuos, de las principales especies que son alimentadas con balanceado, en alimento o fertilizante para otras especies de diferentes niveles tróficos (Chopin *et al.*, 2001). La aplicación de los conceptos de IMTA podría contribuir al incremento de la productividad, basado en la diversidad de niveles tróficos. Adicionalmente, la utilización de especies de diferentes niveles tróficos podría permitir la máxima utilización de nutrientes presentes en las dietas.

El presente trabajo presenta varios casos de estudio de sistemas IMTA en BFT, con una perspectiva productiva y ecológica.

2. Materiales y Métodos

Acuaponía de camarón y salicornia

Fue realizado un experimento por 73 días comparando dos tratamientos: uno con cultivo de camarón en biofloc (sin plantas) y otro adicionando al cultivo de camarón un sistema acuapónico con *Salicornia ambigua* (con plantas), cada grupo con cuatro repeticiones. Las unidades experimentales consistieron en tanques de 800 L, un decantador de 40 L y un sistema hidropónico con 0,4 m² en cada unidad experimental con plantas se dispuso 40 plantas y en el tratamiento sin plantas, solamente se dispuso el sistema hidropónico, sin las plantas. El agua del tanque de los camarones fue bombeada continuamente para el decantador y distribuida en las camas hidropónicas para irrigar las plantas, después retornaba por gravedad para el tanque de cultivo de camarón (es sistema se describe en la figura 1, adaptada

Esmeralda Chamorro Legarda, Felipe do Nascimento Vieira, Claudia Machado, Walter Quadros Seiffert. 2019. Cultivos Multitróficos con la Tecnología de Biofloc: Incrementando la Eficiencia del Uso de los Nutrientes de la Dieta Eficiencia de Nitrógeno y Fósforo con IMTA en BFT. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisiones en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 348-362.

de Pinheiro *et al.*, 2017). Los tanques fueron poblados con 250 camarones m^{-3} (peso promedio de 1,4 g). Los camarones fueron alimentados con balanceado comercial con 35% de proteína bruta, cuatro veces al día. Al final del experimento fue determinado el nitrógeno y fósforo de los camarones, plantas y del balanceado comercial.

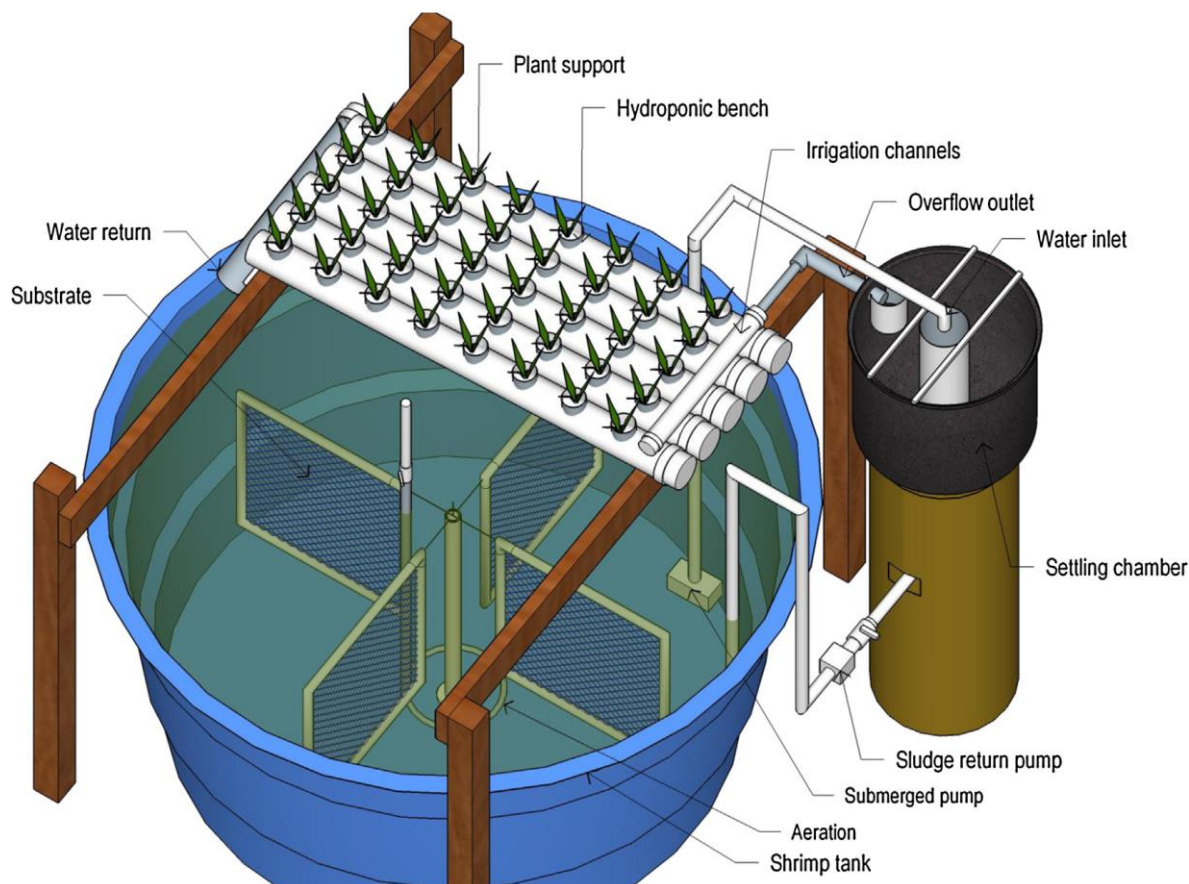


Figura 1. Unidad acuapónica utilizada en el experimento. Adaptada de Pinheiro *et al.*, 2017.

Cultivo integrado de camarones y tilapias

Fue realizado un experimento por 57 días, donde fueron evaluados cuatro niveles de densidad de peces para camarones en biofloc: 0, 8, 16 y 24 peces por tanque (90 L de volumen útil), cada nivel con cuatro repeticiones. El peso inicial fue $4,8 \pm 0,1$ g y $9,6 \pm 0,1$ g de camarones y peces, respectivamente. Los camarones fueron alimentados de acuerdo con tabla de alimentación y los peces fueron alimentados con 1% de la biomasa de peces, para estimular el consumo de biofloc por parte de las tilapias. Al final inicio y al final del experimento fue

Esmeralda Chamorro Legarda, Felipe do Nascimento Vieira, Claudia Machado, Walter Quadros Seiffert. 2019. Cultivos Multitróficos con la Tecnología de Biofloc: Incrementando la Eficiencia del Uso de los Nutrientes de la Dieta Eficiencia de Nitrógeno y Fósforo con IMTA en BFT. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 348-362.

evaluada la concentración de nitrógeno y fósforo en los camarones, peces y el balanceado. La descripción se encuentra en la figura 2, adaptada de Poli *et al.*, 2019a.

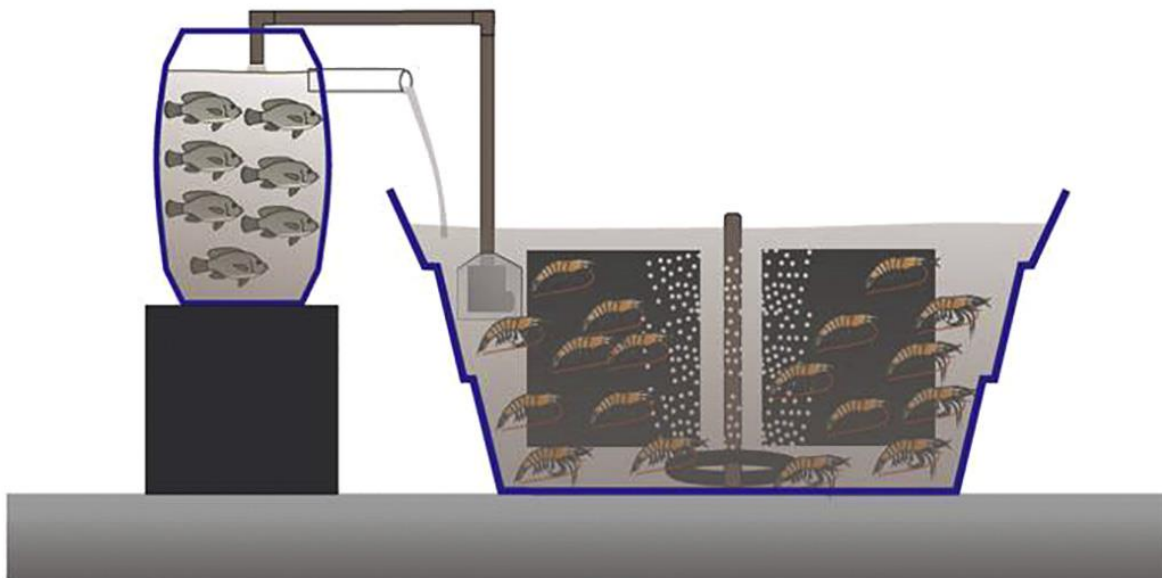


Figura 2. Esquema del cultivo experimental de tilapia y camarón, adaptado de Poli *et al.*, (2019a).

Cultivo AMTI de camarones, tilapias y salicornia

El sistema multitrófico consistió en un tanque para el cultivo de camarón en tanques de 800 L, un tanque de cultivo de tilapia de 90 L y un sistema hidropónico de 0,33 m² para plantar la halófito *Salicornia ambigua*. Una bomba sumergible constantemente circulaba agua del tanque de camarón para el tanque de tilapias, seguidamente por gravedad irrigaba las canaletas hidropónicas y retornaba para el tanque de camarón. El sistema hidropónico fue dispuesto con 32 plantas, los camarones fueron estocados con una densidad de 312 camarones m⁻³ y las tilapias fueron estocadas con 445 tilapias m⁻³. El mismo sistema fue utilizado para el control, pero sin las plantas halófitas. El peso inicial fue para el camarón 4,09 ± 0,025 g; tilapia 1,16 ± 0,02 g; y salicornia 1,17 ± 0,175 g. Los camarones fueron alimentados con tabla de alimentación, los peces con 1% de la biomasa inicial, para estimular el consumo del excedente de biofloc del sistema. La metodología completa se encuentra en la figura 3, adaptada de Poli *et al.*, 2019b.

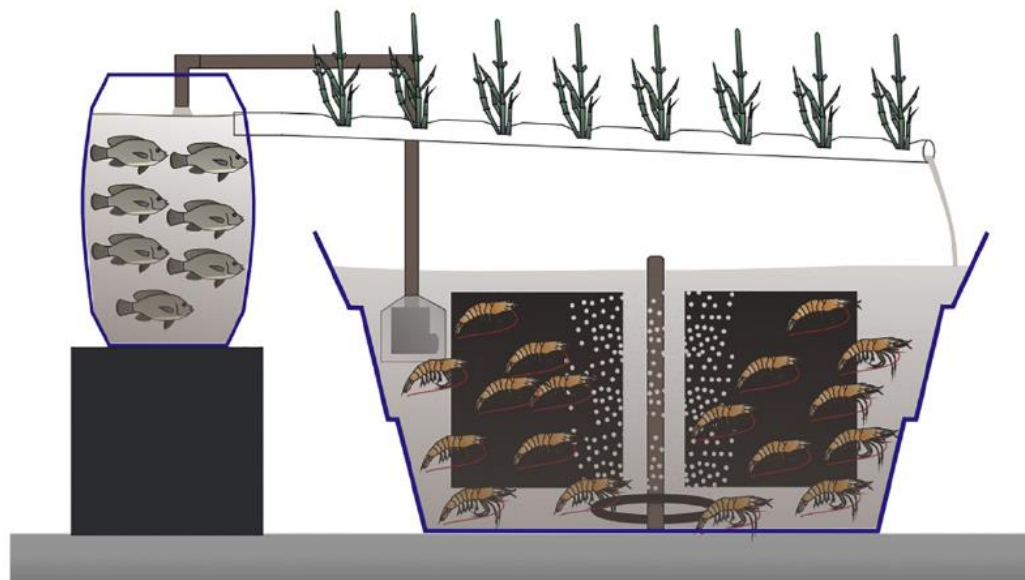


Figura 3. Cultivo AMTI de camarones, tilapias y salicornia, adaptada de Poli *et al.*, 2019b.

Cultivo integrado de camarones y lisas en BFT

Fueron comparados dos sistemas de cultivo, el primer sistema consiste en el cultivo de camarón y lisas en biofloc (tratamiento Camarón+Lisa) y el segundo sistema solamente el camarón sin lisas (tratamiento Camarón) durante 53 días. Se utilizó un tanque de 800 L de volumen útil para el cultivo de camarón con 250 camarones m^{-3} y otro tanque de 90 L de volumen útil destinado al cultivo de lisa (15 peces por tanque) en el tratamiento Camarón+Lisa. El tratamiento Camarón también usó el tanque de 90 L, pero sin los peces. El agua recirculaba desde el tanque de los camarones hacia el tanque de las lisas por medio de una bomba y retornaba por gravedad para el tanque de los camarones. Los camarones fueron alimentados cuatro veces al día. Fue usada una tabla de alimentación para ajustar semanalmente la cantidad de alimento de los camarones y las lisas fueron alimentadas con relación de 1% de la biomasa inicial para estimular el consumo de biofloc. La descripción de la metodología completa se encuentra en la figura 4, adaptada de Legarda *et al.*, 2019.

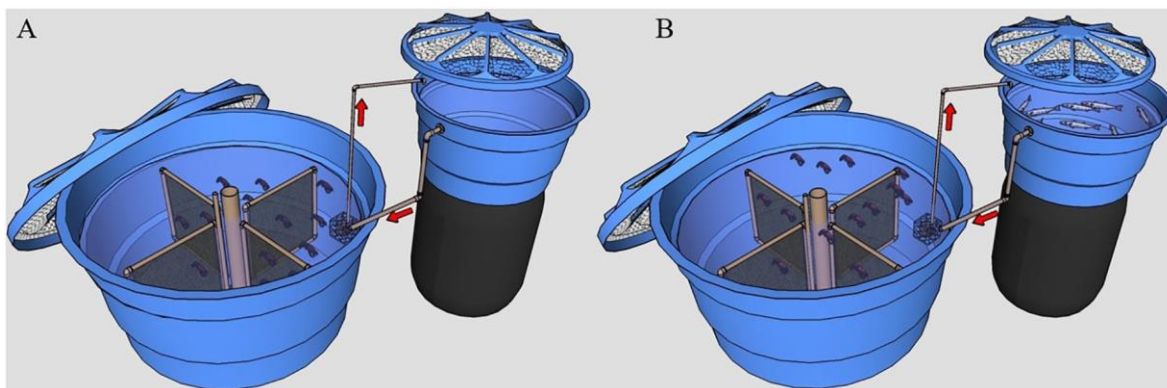


Figura 4. Esquema de la unidad experimental del Cultivo integrado de camarones y lisas en BFT. A) cultivo de camarón sin lisa (Camarón). B) cultivo de camarón y lisas (Camarón+Lisas). Adaptado de Legarda *et al.*, 2019.

Cultivo AMTI de camarones, lisas y *Ulva* sp.

Fue realizado un experimento por 55 días cultivando camarones en sistema de biofloc (250 camarones m^{-3}), lisas (10% de la biomasa final estimada de camarón) y ulvas ($2g L^{-1}$), fueron comparados dos tratamientos: el primero el sistema de cultivo de camarón, lisa y ulva (tratamiento ulva), con otro tratamientos con camarón, lisas y sin ulva (tratamiento control), cada tratamiento con cuatro repeticiones. Fue utilizado un tanque de 800 L para el cultivo de camarón, un tanque de 90 L para el cultivo de lisas y un tanque con fondo en U para el cultivo de *Ulva* sp., las unidades experimentales que destinadas al cultivo control (sin *Ulva*) tenían también el tanque pero sin la macroalga. El Agua circulaba constantemente desde el tanque de cultivo de camarón para el tanque de los peces por medio de una bomba y por gravedad volvía para el tanque de los camarones, para el tanque de las macroalgas semanalmente se paraba esta recirculación y se retornaba el agua para el tanque de los camarones y del tanque de los peces se tomaban 15 L que correspondían a 25% de biofloc, este biofloc era filtrado y los lodos filtrados eran retornados al tanque de los camarones.

3. Resultados y Discusión

La baja absorción de nitrógeno es uno de los principales problemas técnicos, económicos y ambientales de la acuicultura. En promedio, solo el 25% del nitrógeno es absorbido por los

organismos acuáticos (Avnimelech, 2015). El resto de este nitrógeno se excreta en el agua en forma de amoníaco, que, a su vez, se vuelve tóxico para los animales acuáticos. Además, el alimento representa más del 50% de los costos de producción acuícola, y el nitrógeno es el ingrediente alimenticio más caro. En el trabajo evaluando la acuaponía de camarones y salicornia, fue observado que la producción de biomasa de plantas fue el doble de la biomasa de camarón, incrementando la retención de nitrógeno en 25% Figura 5.

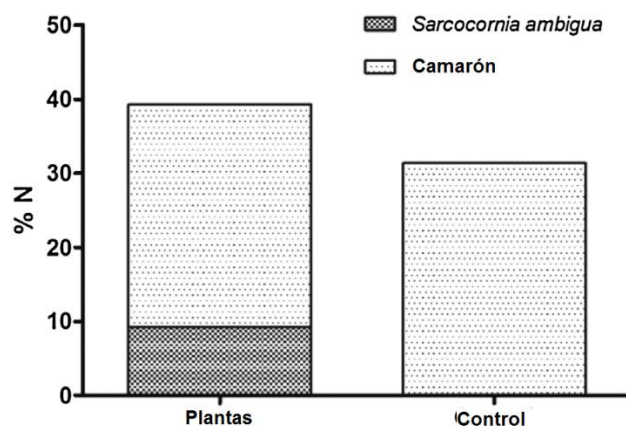


Figura 5. Retención de nitrógeno (%) en la biomasa de camarones y plantas cultivadas en sistema acuapónico por 73 días. Imagen adaptada de Pinheiro *et al.*, 2017.

El fósforo, junto con el nitrógeno, también es una fuente principal de contaminantes en ambientes acuáticos. Su recuperación en camarones es aproximadamente del 11% (Avnimelech y Ritvo, 2003), mientras que el resto se excreta y deposita en ambientes adyacentes. En el ensayo que evaluó la integración de camarones y tilapias, se incrementó la productividad en 31,3% (Tabla 1), resultando en una retención de nitrógeno y fosforo 27,9% y 223%, respectivamente (Figura 6)., esto podría explicarse por la cantidad de estructura ósea presente en los peces, este resultado fue la mayor ganancia ecológica del sistema. De esta manera, estos resultados representan un avance económico y ambiental para los camarones criados en un sistema de biofloc.

Tabla 1. Rendimiento de *Litopenaeus vannamei* y *Oreochromis niloticus* en un sistema biofloc integrado con diferentes densidades de población de peces durante 57 días. Tabla adaptada de Poli *et al.*, 2019a.

	T0	T8	T16	T24	p ANOVA
Camarón					
Peso promedio final (g)	15.0 ± 0.2	14.9 ± 0.4	14.8 ± 1.1	14.9 ± 0.6	0.8354
Sobrevivencia (%)	92.4 ± 1.7	93.6 ± 1.6	96.1 ± 8.8	92.7 ± 5.9	0.9313
FCR	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	0.0680
Tasa de crecimiento (g semana ⁻¹)	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.2 ± 0.1	0.8730
Biomasa Final (kg)	3.1 ± 0.0	3.1 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.1 ± 0.1	0.2895
Productividad (kg m ⁻³)	3.9 ± 0.0	3.9 ± 0.2	4.0 ± 0.1	3.9 ± 0.1	0.2895
Tilapia					
Peso promedio final (g)	-	66.4 ± 11.7	59.7 ± 9.7	59.6 ± 6.7	0.5432
Sobrevivencia (%)	-	84.5 ± 18.5	89.0 ± 3.1	100 ± 0.0	0.0826*
FCR	-	0.21 ± 0.1	0.24 ± 0.0	0.22 ± 0.0	0.4724*
SGR (% día ⁻¹)	-	3.5 ± 0.4	3.2 ± 0.1	3.2 ± 0.2	0.3288
Biomasa final (kg)	-	0.44 ± 0.1 ^c	0.67 ± 0.1 ^b	1.4 ± 0.1 ^a	0.0000
Productividad (kg m ⁻³)	-	4.9 ± 1.1 ^c	7.5 ± 1.1 ^b	15.9 ± 1.6 ^a	0.0000
Camarón + Tilapia					
Biomasa final total (kg)	3.1 ± 0.0 ^d	3.6 ± 0.2 ^c	4.0 ± 0.1 ^b	4.5 ± 0.1 ^a	0.0000
Productividad total (kg m⁻³)	3.5 ± 0.0 ^d	4.1 ± 0.2 ^c	4.6 ± 0.1 ^b	5.1 ± 0.2 ^a	0.0000

Valores presentados en promedio ± desvío estándar. Letras diferentes en la misma línea indican diferencias estadísticas por la prueba de Tukey test (p < 0.05). * P valor por la prueba de Kruskal-Wallis. FCR: tasa de conversión alimenticia. SGR: Tasa de crecimiento específico.

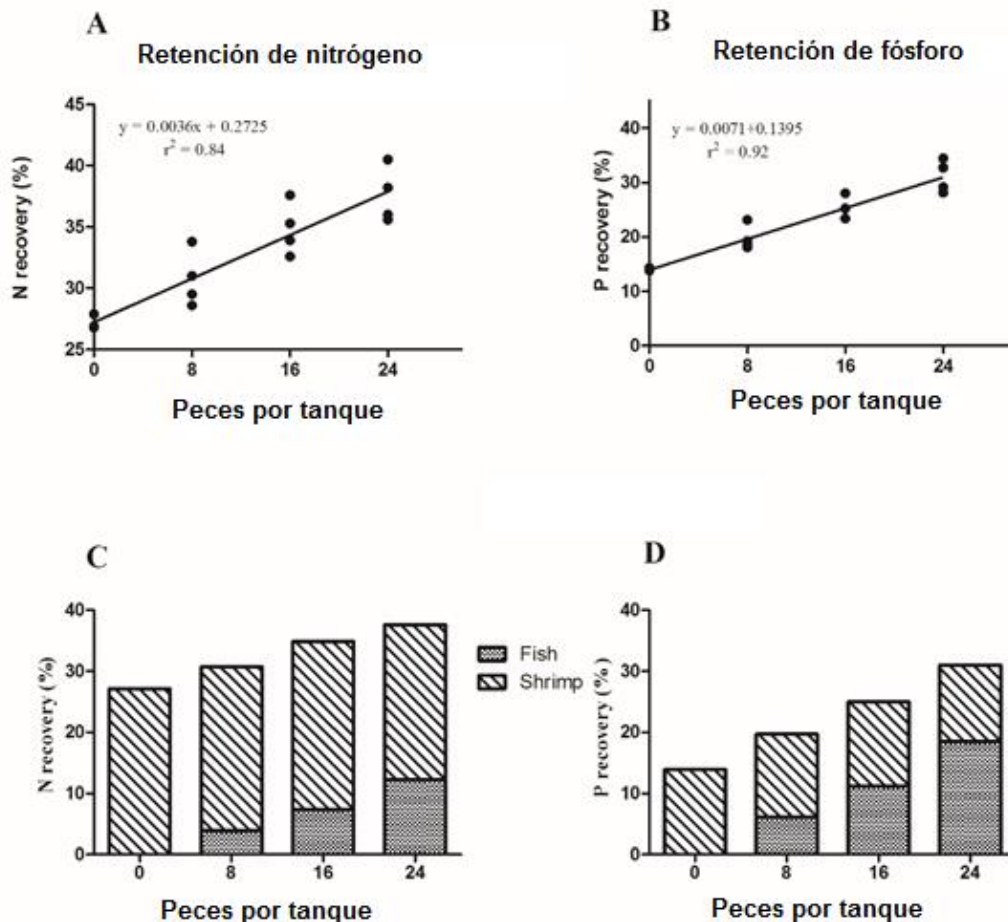


Figura 6. Retención de nitrógeno y fósforo en camarones y peces cultivados en un sistema biofloc integrado durante 57 días: A) regresión lineal para la retención de nitrógeno en el sistema; B) regresión lineal para la retención de fósforo en el sistema; C) Retención de nitrógeno (%) en camarones y peces; D) Retención de fósforo (%) en camarones y peces. Figura adaptada de Poli *et al.*, 2019a.

Con la incorporación de la salicornia en el sistema integrado de camarones y tilapias, resultó en 12% de incremento en la productividad (Tabla 2), sin embargo, sin incrementar la retención de nitrógeno y fosforo. El valor alcanzado en el presente estudio fue más alto que los valores reportados en un monocultivo de camarones biofloc (Poli *et al.*, 2019a). De manera similar, en un estudio en el que los camarones integrados se criaron en un sistema

biofloc con la halófito *Sarcocornia ambigua*, Pinheiro *et al.* (2017) informaron un aumento del 25% en la recuperación de nitrógeno en relación con el tratamiento con monocultivo, lo que respalda la idea de que la integración puede lograr un mejor uso del nitrógeno de los piensos.

Tabla 2. Índices productivos de *Litopenaeus vannamei* y *Oreochromis niloticus* en un sistema biofloc integrado con diferentes densidades de población de peces durante 57 días. Tabla adaptada de Poli *et al.*, 2019b.

	IMTA	Control	p-valor
Camarón			
Peso promedio final (g)	14.6 ± 0.4	14.1 ± 0.2	0.0906
Sobrevivencia (%)	88.0 ± 4.0	89.3 ± 2.4	0.6083
FCR	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	0.6535
Tasa de crecimiento (g Semana ⁻¹)	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.0	0.1313
Biomasa Final (kg)	3.2 ± 1.5	3.1 ± 0.9	0.5886
Tilapia			
Peso promedio final (g)	11.4 ± 1.2	11.5 ± 1.1	0.8589
Sobrevivencia (%)	91.3 ± 3.2	87.5 ± 7.4	0.4453
FCR	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.6535
SGR (% día ⁻¹)	4.41 ± 0.17	4.39 ± 0.20	0.8943
Biomasa final (kg)	0.42 ± 0.06	0.40 ± 0.03	0.5737
Salicornia			
Peso promedio final (g)	23.0 ± 6.26		
Sobrevivencia (%)	92.19 ± 4.03		
Biomasa (kg)	0.68 ± 0.20		
Camarón + tilapia + salicornia			
Biomasa final total (kg)	4.30 ± 0.34 ^a	3.56 ± 0.08 ^b	0.0051
Productividad final total (kg m⁻³)	4.83 ± 0.38 ^a	3.99 ± 0.09 ^b	0.0051

Valores presentados en promedio ± desvío estándar. Letras diferentes en la misma línea indican diferencias estadísticas por la prueba de T-test (p < 0.05). FCR: tasa de conversión alimenticia. SGR: Tasa de crecimiento específico.

Los animales cultivados en acuicultura fijan en sus tejidos pequeños porcentajes de nutrientes, por ejemplo, los camarones fijan del 6 - 21% del fósforo del alimento (Avnimelech, 2015), y los peces 27.3% (Crab *et al.*, 2007; Avnimelech, 2015), el resto se pierde en los efluentes y también representa pérdidas económicas. En el sistema integrado de camarones y lisas, la retención de fosforo fue 16,8% superior en el sistema con lisas (Tabla 3). Probablemente como resultado del depósito de fósforo en la estructura ósea del pez, según lo observado por Hoang *et al.* (2018) y Poli *et al.* (2019a) Por lo tanto, la integración de especies aumenta la retención de fósforo, puede disminuir el impacto ambiental y genera biomasa de peces que se puede cosechar para la alimentación humana o como ingrediente para la alimentación animal.

Tabla 3. Retención de nitrógeno y fósforo para camarones y lisas cultivados en un sistema de biofloc integrado con *Litopenaeus vannamei* más *Mugil curema* (Camaron+Lisa) y un sistema de biofloc con camarones sin salmonetes (Camarón) durante 53 días. Tabla adaptada de Legarda *et al.*, (2019).

Parámetro	Camarón+Lisa	Camarón	<i>p</i>
Retención de nitrógeno (%)	28.1 ± 0.37	27.7 ± 2.19	0.75
Retención de fósforo (%)	11.1± 0.54*	9.5 ± 0.74*	0.03

Valores presentados como promedio ± desvío estándar. * Indican diferencias por la prueba *T* de Student ($p < 0.05$).

Similar, la incorporación de la *Ulva* sp. al sistema integrado de camarones y lisas resultó en el incremento de la retención de nitrógeno en 5,5% y de fósforo en 7,5% en relación con el sistema sin macroalgas (*Ulva* sp.), los resultados se pueden observar en la Tabla 4. Las macroalgas son utilizadas para biorremediación y en este caso observamos que integradas al cultivo con camarón y lisas en sistema de biofloc pueden contribuir para disminuir los efluentes y aprovecharlos para utilizarlos, por ejemplo, en dietas para los propios animales ya que estas algas generando una economía circular.

Tabla 4. Retención de nitrógeno y fósforo en un *Litopenaeus vannamei*, *Mugil liza* y *Ulva lactuca* en un sistema de cultivo biofloc integrado durante 55 días. Tabla adaptada de Legarda *et al.* (datos no publicados).

Parámetro	Control	Ulva	<i>p</i> valor
Retención de nitrógeno (%)	27.6 ± 0.8	29.2 ± 0.1*	0.005
Retención de fósforo (%)	9.7 ± 0.3	10.5 ± 0.3*	0.019
Valores presentado como promedio ±desviación estandar. * Indican diferencias por la prueba <i>T</i> de Student (<i>p</i> < 0.05).			

4. Conclusión

De este modo, queda demostrado que la utilización de los conceptos de AMTI al sistema de biofloc aumentan la eficiencia del uso de nitrógeno y fosforo de la dieta en el cultivo de camarón blanco del Pacífico en sistema de biofloc.

Referencias

- Avnimelech, Y. & Ritvo, G. (2003). Shrimp and fish pond soils: Processes and management. *Aquaculture* 220, 549–567. doi:10.1016/S0044-8486(02)00641-5
- Avnimelech, Y. (2015). Biofloc technology – A practical guide book. A practical guide book. *The World Aquaculture* 258. doi:10.13140/2.1.4575.0402
- Chopin, T., Buschmann, A.H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraemer, G.P., Zertuche-González, J.A., Yarish, C. & Neefus, C. (2001). Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: A key toward sustainability. *Journal of Phycology*. doi:10.1046/j.1529-8817.2001.01137.x
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P. & Verstraete, W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006>
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B. & Bisogni, J.J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346–358. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.03.019
- FAO-FIGIS (Fisheries Global Information System) - Web site. Fisheries Global Information System (FIGIS). FI Institutional Websites (2019). In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Roma. Updated. [cited 03 Oct 2019]. <http://www.fao.org/figis/servlet/TabSelectorGAJARDO> *et al.*, 2019
- FAO (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Hoang, M.N., Nguyen, P.N., Le, D.V.B., Nguyen, D.V. & Bossier, P. (2018). Effects of stocking density of gray mullet *Mugil cephalus* on water quality, growth performance, nutrient conversion rate, and microbial community structure in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* integrated system. *Aquaculture* 496, 123-133. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.018>
- Legarda, E. C., Poli, M. A., Martins, M. A., Pereira, S. A., Martins, M. L., Machado, C., De Lorenzo, M. A. & Do Nascimento Vieira, F. (2019). Integrated recirculating aquaculture system for mullet and shrimp using biofloc technology. *Aquaculture*, 512, 734308.
- McIntosh, D., Samocha, T.M., Jones, E.R., Lawrence, A.L., McKee, D.A., Horowitz, S. & Horowitz, A. (2000). The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. *Aquacultural Engineering* 21, 215–227. doi:10.1016/S0144-8609(99)00030-8
- Otoshi, C.A., Naguwa, S.S., Falesch, F.C. & Moss, S.M. (2007). Shrimp behavior may affect culture performance at super-intensive stocking densities. *Global Aquaculture Advocate* 2, 67-69.
- Pinheiro, I., Arantes, R., Espírito Santo, C.M., Nascimento Vieira, F., Lapa, K.R., Gonzaga, L.V., Fett, R., Barcelos-Oliveira, J.L. & Seiffert, W.Q. (2017). Production of the halophyte *Sarcocornia ambigua* and

- Pacific white shrimp in an aquaponic system with biofloc technology. *Ecological Engineering* 100, 261–267. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.12.024
- Poli, M.A., Legarda, E.C., Lorenzo, M.A., Martins, M.A. & Vieira, F.N. (2019a). Pacific white shrimp and Nile tilapia integrated in a biofloc system under different fish-stocking densities. *Aquaculture* 498, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.045>.
- Poli, M. A., Legarda, E. C., De Lorenzo, M. A., Pinheiro, I., Martins, M. A., Seiffert, W. Q. & Do Nascimento Vieira, F. (2019). Integrated multitrophic aquaculture applied to shrimp rearing in a biofloc system. *Aquaculture*, 511, 734274.
- Samocha, T.M., Schweitzer, R., Krummenaeur, D. & Morris, T.C. (2012). Recent advances in super-intensive, zero-exchange shrimp raceway systems. *Global Aquaculture Advocate* 15 (6), 70–71.
- Schweitzer, R., Arantes, R., Costódio, P.F.S., Santo, C.M.E., Vinatea, L.A., Seiffert, W.Q.S. & Andreatta, E.R. (2013). Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquacultural Engineering* 56, 59–70. doi:10.1016/j.aquaeng.2013.04.006
- Van-Wyk, P. (1999). Nutrition and Feeding of *Litopenaeus vannamei* in Intensive Culture Systems. Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Florida.
- Xu, W.J., Pan, L.Q., Zhao, D.H. & Huang, J. (2012). Preliminary investigation into the contribution of bioflocs on protein nutrition of *Litopenaeus vannamei* fed with different dietary protein levels in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture* 350–353, 147–153. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.04.003

Agradecimientos a consideración

Al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por las becas de investigación de Felipe do Nascimento Vieira (305357/2017-4), FAPESC. El presente trabajo también fue realizado con el apoyo de la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Empleo de Suplementos Nutricionales en Larvas de Peces y Crustáceos, Acuabio V Caso Específico

Rebeca Martínez ¹, Antonio Morales¹, Fidel Herrera¹, Osmany González¹, Liz Hernández¹, Mirta Vinjoy², Héctor Cabrera³, Yandiesky Lowery¹, Lincidio Perez¹, Mario Pablo Estrada.¹

¹Proyecto de Modificadores Metabólicos, Departamento de Biotecnología Animal, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, PO Box 6162, Habana, Cuba

² Centro EDTA Cotorro, La Habana.

³ Centro de Desove de Camarón, Empresa Yaguacam, Cienfuegos.

E mail rebeca.martinez @cigb.edu.cu

Resumen

Las condiciones de alta densidad de peces durante la acuicultura producen estrés y una mayor susceptibilidad a los patógenos oportunistas en los animales. El desarrollo de la biotecnología acuática ha generado varias estrategias experimentales dirigidas a manipular el crecimiento de organismos acuáticos. El uso de suplementos nutricionales y dietas adecuadas son de gran importancia en la acuicultura intensiva. En este trabajo informamos sobre la estimulación del crecimiento y el sistema inmune en larvas de tilapia tratadas con el péptido mimético de grelina GHRP-6. Acuabio V es un suplemento nutricional donde se formula el péptido GHRP-6 y la vía de administración es mediante baños de inmersión. Estas cualidades hicieron que el producto fuera muy atractivo por ser utilizado para mejorar la tasa de supervivencia, la calidad y las cantidades de organismos acuáticos en la etapa de larvas, un momento crucial cuando se cultivan tales animales. Se expone la aplicación de Acuabio V en larvas de camarones y tilapia, donde se obtuvo un aumento de peso y altura. Finalmente, se muestran los resultados de la aplicación del producto en condiciones de producción de larvas de camarones, donde hay evidencia de un aumento en la supervivencia de las larvas, en los tanques tratados en comparación con los controles. Para todos estos resultados, la aplicación de estos suplementos nutricionales podría ser muy útil en la acuicultura mundial.

Palabras clave: larva, crecimiento, suplementos nutricionales

Introducción

Con el aumento de la población mundial, la demanda de alimento y específicamente de proteína animal es cada vez mayor. Para satisfacer esta demanda, la producción de proteína animal ha crecido significativamente, entre ellos, el sector de la acuicultura ha experimentado un desarrollo y crecimiento en los últimos años. La cría de los peces es un proceso conformado por diferentes etapas donde la etapa larvaria resulta de gran importancia, pues es donde ocurre la mayor mortalidad, los animales no han desarrollado el sistema inmune completamente, por lo que es un periodo vulnerable para los peces si aparecen en el cultivo, infecciones oportunistas, de bacterias, virus u hongos.

En nuestro laboratorio hemos trabajado durante años en la búsqueda y desarrollo de moléculas que aumenten el crecimiento y el sistema inmune innato en el periodo larvario, tanto de peces como crustáceos (1, 2, 3, 4, 5, y 6). De tal forma, hemos estudiado la acción de péptidos secretagogos de la hormona de crecimiento, tanto en la ganancia de peso y talla como en la estimulación de determinados parámetros del sistema inmune innato.

El péptido sintético GHRP-6 (Growth Hormone-Releasing Peptide 6) es un péptido sintético de 6 aminoácidos (His-(D-Trp)-Ala-Trp-(D-Phe)-Lys-NH₂, MW = 872.44 Da) y constituye un agonista del receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento. Los secretagogos endógenos de la hormona de crecimiento y los compuestos análogos a los secretagogos, poseen numerosas funciones, que no se limitan a la liberación controlada de hormona de crecimiento, sino que incluye: el control y regulación del apetito y la ganancia de peso, la estimulación del sistema inmune, la cardioprotección, entre otras. La mayoría de los efectos de estos compuestos se han observado en mamíferos, aves y peces

Empleando el péptido GHRP-6 hemos demostrado en estudios previos la estimulación de la liberación de la hormona de crecimiento endógena en tilapias adultas, así como la estimulación del crecimiento al administrar el péptido por vía oral, baños de inmersión y por la dieta. Al realizar estudios en estos animales se ha evidenciado la estimulación del sistema inmune innato en los peces. Con la experiencia acumulada se ha generado un producto novedoso para ser administrado

por baños de inmersión en larvas de peces y crustáceos, llamado Acuabio V, que permite aumentar crecimiento, resistencia a enfermedades y sobrevivencia de las larvas tratadas.

Materiales y Métodos

El producto Acuabio V se produce en el CIGB, se utiliza según las recomendaciones del producto, baños de inmersión, el sobre que posee 5.3 g, para tratar 500 L. El producto es un polvo blanco, homogéneo, que se disuelve en agua. El ingrediente activo de este producto es el péptido GHRP-6 junto a otros componentes, que permiten mantener su estabilidad química y acción biológica por 2 años después de ser producido.

El ensayo con las larvas de tilapia (*Oreochromis sp*) se llevó a cabo en el Centro Acuícola de Mamposton, y las larvas de langosta de agua dulce *Cherax* fueron obtenidas en la Mini estación acuícola del CIGB en la mini estación acuícola del CIGB.

Las larvas de tilapia y de langosta de agua dulce, fueron seleccionadas para formar un grupo control y un grupo tratado. No había diferencias significativas entre los pesos de ambos grupos.

El ensayo con los nauplios de camarón fueron obtenidos en el Centro de Desove de Yaguanabo, perteneciente a la empresa YAGUACAN de la provincia Cienfuegos, Cuba

En todos los casos se mantuvieron las condiciones de manejo y alimentación de las larvas, incluyendo en el proceso los baños de inmersión con el producto, durante 1 hora.

Resultados y Discusión

Los baños de inmersión son una práctica común en la acuicultura para administrar hormonas, péptidos, antibióticos, inmunoestimulantes y vacunas. Por tal razón se escogió esta forma de administración además de constituir una manera segura y generar menor estrés en los animales.

Se bañaron las larvas tres veces por semana, durante tres semanas, al final se pesaron, y se obtuvo diferencias significativas en la ganancia de peso del grupo tratado con respecto al control. El conteo de ectoparásitos en estos grupos arrojó que en los animales tratados era menor la presencia de los patógenos, con respecto al control.

Este resultado demuestra la acción inmuno estimulante del producto en los peces en este periodo que se evalúa.

Tabla 1. Acción de Acuabio V en larvas de tilapia después de 21 días de crecimiento

	Peso (g)	Talla (cm)	Altura (cm)
Control	$0,23 \pm 0,17$	$2,34 \pm 0,48$	$0,63 \pm 0,17$
Acuabio V	$0,41 \pm 0,22^*$	$2,81 \pm 0,48^*$	$0,74 \pm 0,21^*$

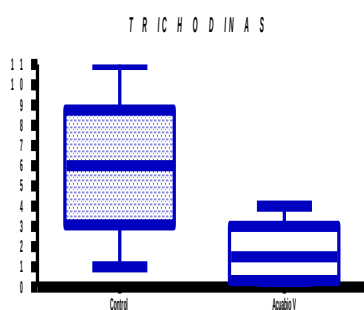
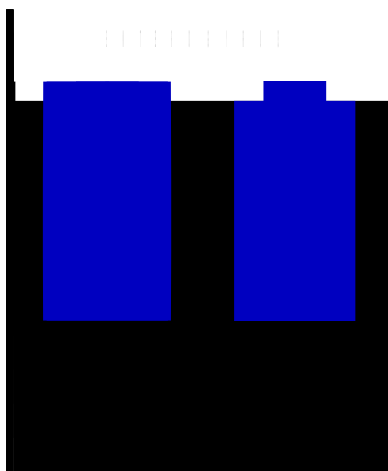


Fig 1 . Resistencia a patógenos en las larvas de tilapia tratadas con el producto Acuabio V en comparación con los peces controles. Se evaluaron dos tipos de ectoparásitos, Trichodinas y Enterogyrus. N= 15



El ensayo realizado con larvas de langosta de agua dulce, *Cherax quadricarinatus*, confirmó la acción de este producto en crustáceos. Se evidenció una buena sobrevida de las mismas.

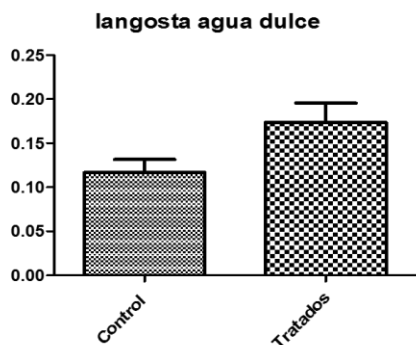


Fig 2: Acuabio V es capaz de incrementar el peso de las larvas de langosta dulce, *Cherax quadricarinatus* dulce después de 21 días de tratamiento. Las diferencias obtenidas son estadísticamente significativas $p=0.03$.

Estudios previos que se realizaron experimentos para evaluar el efecto biológico del péptido sintético GHRP-6 en el crecimiento de larvas (protozoa I) de *Litopenaeus schmitii* (incremento del peso y la talla) demostraron que el grupo tratado con $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de péptido mostró un incremento significativo en estos parámetros comparado con el grupo control.

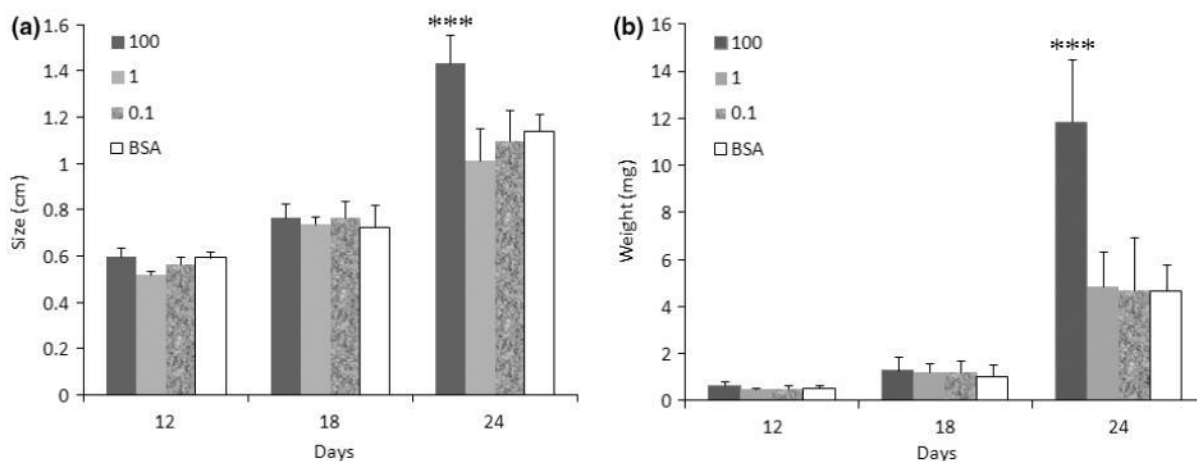


Figura 3. Experimento de crecimiento en larvas de *Litopenaeus schmitii* inmersas en el péptido sintético GHRP-6 durante 24 horas. (a) Talla en centímetros (cm). (b) Peso corporal en miligramos (mg). El grupo control negativo recibió BSA como una proteína no relacionada. *** indica $p<0.001$.

El número de espinas rostrales y arcos branquiales son una medida del crecimiento y la calidad de las larvas en la cría de camarones. Particularmente, el desarrollo de las branquias es muy importante y puede inducir la protección contra el estrés osmótico, especialmente durante períodos

críticos de sus ciclos de vida. En este estudio las larvas del grupo tratado con la mayor dosis del péptido GHRP-6 mostraron un incremento en el número de arcos branquiales y de espinas rostrales (Figura 4) y a su vez tuvieron mayores niveles de supervivencia, comparado con el grupo control.

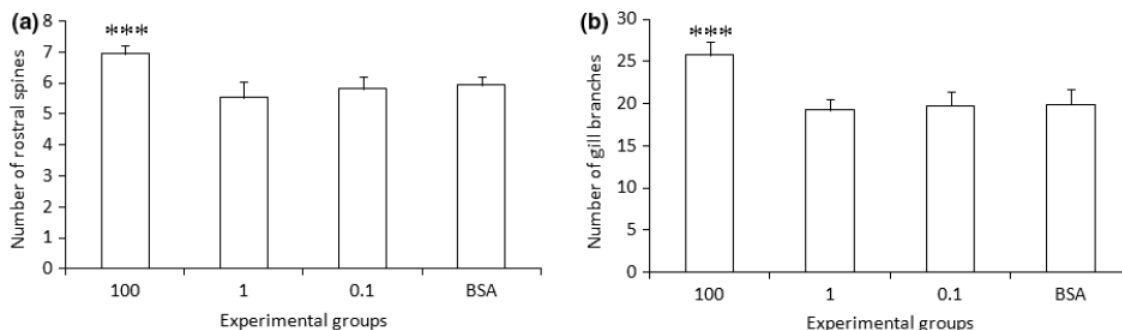


Figura 4. (a) Número de espinas rostrales y (b) arcos branquiales el día 24 del experimento de crecimiento de *Litopenaeus schmittii*, mediante baños de inmersión. El grupo control negativo recibió BSA como una proteína no relacionada. *** indica $p < 0.001$.

El efecto del péptido GHRP-6 en el crecimiento de post-larvas de *Litopenaeus vannamei* fue evaluado mediante el peso corporal y el incremento de la talla. La administración del péptido (200 $\mu\text{g L}^{-1}$) mediante baños de inmersión permitió un incremento significativo en el peso corporal y la talla comparado con el grupo control

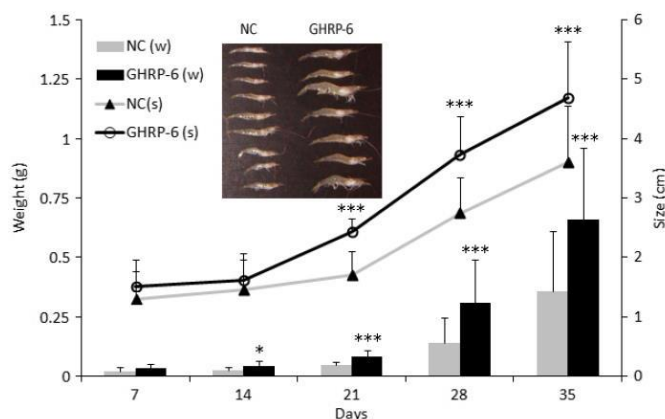


Figura 5. Experimento de crecimiento en post-larvas de *Litopenaeus vannamei* inmersas en GHRP-6 durante 35 días. Eje izquierdo: peso corporal (w en la leyenda) en gramos (g). Eje derecho: tamaño (s en la leyenda) en centímetros (cm). La figura arriba corresponde a muestras a los 35 días de tratamiento. * indica $p < 0.05$; *** indica $p < 0.001$.

En camarones peneidos, un mayor contenido de proteínas solubles ha sido asociado con los animales que muestran la mayor tasa de crecimiento. En este trabajo, el mayor contenido de proteínas se observó en las larvas tratadas con GHRP-6 (Figura 6A), indicando una conexión con el metabolismo proteico.

Por otra parte, el conteo total de hemocitos (THC, por sus siglas en inglés) ha sido informado como un indicador potencial de la respuesta inmune en crustáceos, especialmente en camarones, y un número superior al normal de hemocitos circulantes en estos organismos se correlaciona con una resistencia incrementada a los patógenos. En este estudio, los THC resultaron incrementados en *L. vannamei* tratados con GHRP-6, comparado con el grupo control (Figura 6 B).

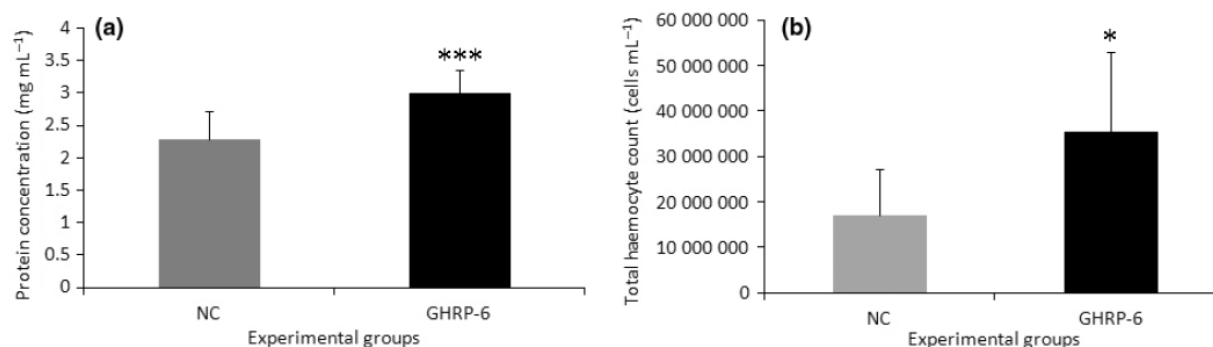


Figura 6. (a) Concentración de proteínas totales en homogenados de camarones. (b) Número total de hemocitos en la hemolinfa de camarones en el día 35 del experimento de crecimiento en *Litopenaeus vannamei*. * indica $p < 0.05$; *** indica $p < 0.001$.

El ensayo que se realizó aplicando el producto Acuabio V en nauplios de camarón, *Litopenaeus vannamei*, se realizó en colaboración con los especialistas que realizan el cultivo de larvas de camarón en Yaguacam, Cienfuegos, se aplicó en días alternos el producto en piscinas de 20 L durante la primera semana, y después se distanciaron los baños, hasta completar la etapa a post larva 10. Se obtuvo un incremento de la sobrevivencia de las larvas tratadas al compararlas con el control y la diferencia mayor se observa al comparar el estadio de Nauplio a PL 2, es mayor el rendimiento alcanzado al emplear Acuabio V.

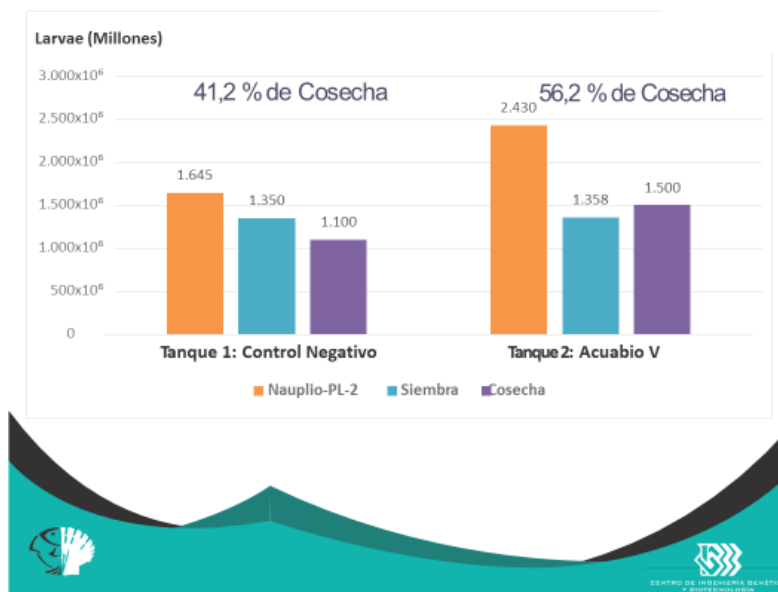


Fig. 7 Resultados de la aplicación de Acuabio V en las etapas iniciales del cultivo de las larvas de camarón *Litopenaeus vannamei*

En la industria de la acuicultura, se persigue la prevención de enfermedades mediante la vacunación o empleando inmuno estimulantes, siendo este un método apropiado para el control de patógenos tanto desde el punto de vista económico como el ambiental. Es por ello que constituye un objetivo de esta industria la búsqueda de moléculas alternativas o ciertas combinaciones de ellas que estimulen el sistema inmune con el fin de incrementar el bienestar de los animales sin reducir los niveles de protección.

Conclusiones

El producto Acuabio V es capaz de incrementar peso, talla y sobrevida en larvas de peces y crustáceos, así como incrementa estimula el sistema inmune y la resistencia a patógenos aumenta en esta etapa de gran importancia para el proceso de cría de los peces, es por ello que se recomienda el uso de este producto novedoso en la acuicultura.

Referencias

1. A novel GH secretagogue, A233, exhibits enhanced growth activity and innate immune system stimulation in teleosts fish. Martinez R., Ubieta K, Herrera, F, Forellat, A, Morales R, de la Nuez A, Rodriguez, R, Reyes, O, Oliva, A, Estrada, MP. (2012) *Journal of Endocrinology* 214: 409- 419, 2012.
2. Oral administration of the growth hormone secretagogue-6 (GHRP-6) enhances growth and non-specific immune responses in tilapia (*Oreochromis sp.*) Rebeca Martinez, Yamila Carpio, Antonio Morales, Juana María Lugo, Fidel Herrera, Claudina Zaldívar, Olimpia Carrillo, Amílcar Arenal, Eulogio Pimentel, Mario Pablo Estrada *Aquaculture* 452 (2016) 304–310
3. Significant improvement of shrimp growth performance by growth hormone-releasing peptide-6 immersion treatments Rebeca Martinez, Yamila Carpio, Amílcar Arenal, Juana Maria Lugo, Reynold Morales, Leonardo Martín, Ramon Franco Rodriguez, Jannel Acosta, Antonio Morales, Jorge Duconge and Mario Pablo Estrada. *Aquaculture Research*, 2017, 1–14
4. A233 Peptide: A Growth Hormone Secretagogue that Promotes an Antiviral Signaling Pathway. Martinez R, Gil L, Ramos Y, Gonzalez LJ, Estrada MP, et al. *J Clin Cell Immunol* 7: 450. (2016) doi:10.4172/2155-9899.1000450
5. Growth Hormone Secretagogue (A233) Improves Growth and Changes the Tissue Fatty Acid Profile in Juvenile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Rebeca Martínez, Carmen Morales, Amílcar Arenal, Antonio Morales, Fidel Herrera, Víctor González, Mario Pablo Estrada. (2018) *Lipids* 53(4):429-436 DOI 10.1002/lipd.12003
6. Semple SL, Rodríguez-Ramos T, Carpio Y, Lumsden JS, Estrada MP and Dixon B (2019) PACAP Is Lethal to *Flavobacterium psychrophilum* Through Either Direct Membrane Permeabilization or Indirectly, by Priming the Immune Response in Rainbow Trout Macrophages. *Front. Immunol.* 10:926. doi: 10.3389/fimmu.2019.00926

Impact of Probiotics on Growth Performance and Immune System: A Meta-Analysis

Amilcar Arenal¹, Adrian Toledo¹, Yailen Valdes-Vaillant¹; Juliet Mejías-Palmero¹; Marileyxis Regla López¹, Laureano Frizzo^{2,3}, Marcelo Signorini^{2,4}, Peter Bossier⁵,

¹Department of Morphophysiology, Agricultural Science Faculty, University of Camagüey Km 5 ½, 74650, Cuba

² Department of Public Health, Faculty of Veterinary Science – National University of the Littoral, Kreder 2805, Esperanza C.P. S3080HOF, Province of Santa Fe, Argentina

³ Laboratory of Food Analysis, Institute of Veterinary Science (ICiVet Littoral), National University of the Litoral, National Council of Scientific and Technical Research (UNL/CONICET), Kreder 2805, (S3080HOF) Esperanza, Province of Santa Fe, Argentina.

⁴ National Council of Scientific and Technical Research, National Institute of Agricultural Technology EEA Rafaela, Ruta 34 Km 227, Rafaela C.P. 2300, Province of Santa Fe, Argentina.

⁵Department of Animal Production, Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center, Ghent University, Belgium

Abstract

The aim of the present work was to assess the effect of probiotic addition growth performance and immune system through meta-analysis, we also discuss about the probiotic mechanism.. PubMed, SciELO and Google Scholar databases were searched in all languages from 1980 to 2019. Phenoloxidase, specific growth rate (SGR) and feed conversion ratio (FCR) were selected as outcomes. We evaluated experimental design, penaeid shrimp species, larval or postlarval stage, probiotic strain, modes of administration among others. A total of 100, 60 and 49 studies were included to assess probiotic effects on SGR and FCR, respectively. Probiotics improved SGR (SMD = 3.811) and FCR (SMD = -3.194) in the pooled standardized mean difference random effect model, considering the source of heterogeneity and publication biases. Of these, 68 met the inclusion criteria for the immune response. Among these are 59 articles that evaluated the activity of phenoloxidase and 11 the expression of genes in proPO. Both prebiotics and probiotics stimulate proPO and phenoloxidase. The plant extracts were the ones that most modified this activity and the *Bacillus* was the most stimulated among the probiotics. Phenoloxidase, SGR and FCR were improved in shrimps treated with probiotic.

Keywords: Probiotic, shrimp, meta-analysis

Introduction

The shrimp industry is one of the fastest-growing aquaculture sectors. Crustaceans have an annual production exceeding 7.35 million metric tons, having a first-sale commercial value of \$38.5 USD billions. *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) and *Penaeus monodon* (Black tiger shrimp) are the most commonly farmed shrimp. Calculated by production, white leg shrimp is the most successful marine crustacean in aquaculture. In 2015, *L. vannamei* reached 75.7% of the world production of all cultivated marine shrimp species (FAO 2017).

Probiotics are living microorganisms that have a beneficial effect on the host by modifying the host-associated or ambient microbial community, by enhancing the feed nutritional value to the host, by enhancing the host response to diseases, or by improving the quality of its ambient environment (Verschuere *et al.* 2000). The main production parameter targets for the use of probiotic organisms are host health, bioremediation, water quality and growth promotion.

The isolation and characterization of new probiotic strains is an open research field, particularly concerning isolates from the environment and/or final host (Wang and Gu 2010; Franco, Martín, *et al.* 2016; Franco, Arenal, *et al.* 2016). The development of suitable probiotics is not a simple task, and requires full-scale experiments, as well as development of appropriate monitoring tools and controlled production (Decamp, Moriarty, and Lavens 2008; Luis-Villasenor *et al.* 2013; Luis-Villaseñor *et al.* 2011).

A probiotic may have one or several modes of action: production of inhibitory compounds; competition for adhesion sites; enhancement of the immune response; improvement of water quality; interaction of phytoplankton; source of macro and micronutrients; and enzymatic contribution to digestion (Ninawe and Selvin, 2009). Consequently, probiotics can contribute towards improving the zootechnical performance through nutrition. Moreover, probiotics could mitigate the effect of stress factors and improve nutrient assimilation by the detoxification of potentially harmful compounds in the diet through hydrolytic enzymes, including amylases and proteases, and the production of vitamins such as biotin and vitamin B₁₂ (Irianto and Austin 2002). The beneficial effects of probiotic microorganisms are influenced by several related factors such as rearing conditions, method of administration, dosage, probiotic strain and shrimp species. As a result, most of the reported literature show inconsistent results concerning the efficacy of probiotic treatments on shrimp survival and growth performance. Meta-analysis is the use of statistical

methods to summarize the results of independent studies and it connotes a rigorous alternative to the causal, narrative discussions of research studies which typify our attempts to make sense of the rapidly expanding research literature (Glass 1976). The aim of the present work was to investigate the effects of probiotics on shrimp survival, growth and phenoloxidase performance by means of a meta-analysis, we also discuss about the probiotic mechanism.

Material and Methods

This meta-analysis was conducted according to the Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines (Moher *et al.* 2015).

Search strategy

PubMed, Google Scholar and SciELO databases were searched for relevant articles published from 1980 to 2019 without language restriction. The databases were searched for relevant articles from 12/20/2017 to 7/20/2019. Keywords included “probiotics”, “shrimp” AND “survival”, “feed conversion ratio (FCR)” OR “specific growth rate (SGR)” OR “Phenol-oxidase”. The scientific articles that met the *a priori* inclusion criteria were selected after evaluation of the abstract. The inclusion criteria allowed the preliminary screening of titles and abstracts. We followed the Jocelyn Clark, in British Medical Journal blog, to avoid predatory journals (Clark, 2015).

Study selection

Two reviewers independently selected eligible primary studies, with disagreement resolved by consensus. To be included in this meta-analysis, studies had to be on shrimps without any apparent disease and the study results had to have been published in peer-reviewed journals, with any data dispersion measure. The term “study” was applied to identify each scientific article, which can include one or more experiments (each experiment being a controlled experiment to compare a particular combination of probiotic fed and control groups of shrimp). The authors of articles that otherwise satisfied the inclusion criteria, but lacked clear dispersion measures, as SD or SEM were contacted for extra information.

Data extraction

The same two reviewers independently extracted the data from the full text of the selected primary studies by using Excel spreadsheet. When the article had more than one probiotic or different doses of the same probiotic, we included each treated group with the control group as an independent experiment in the analysis. Survival, feed conversion ratio and specific growth rate were obtained from each study for both control and probiotic treated groups. Information on the study design, country, stocking density, salinity, method of probiotic administration, number of the strain, and probiotic species were extracted from each article.

Risk of bias within individual studies

Risk of bias within the individual studies was independently evaluated by two reviewers using the Cochrane collaborations tool. The risk of selection bias, performance bias (randomized experiments), multiple publication bias (the multiple publication of research findings related with the number of experiment per article and articles per author), reporting bias (incomplete outcome data SGR, survival or FCR) publication bias (the publication of positive results for probiotic) were judged as high, low or unclear (Higgins *et al.*, 2011). The reviewers resolved uncertainty and disagreement by discussion and consensus.

Statistical analysis

Statistical analysis used Comprehensive Meta-Analysis version 3.0. Due to continuous variables being analyzed, the effects was quantified as standardized mean differences (*SMD*) between control and treatment group by a random effects model which assumes different size effects among studies (Higgins and Green 2011). Also, 95% confidence intervals (*CI*s) using a random effects model were calculated.

Additionally, subgroup analyses were planned depending on factors that could potentially influence the magnitude of the treatment: (1) method of probiotic administration, (2) monostrain or multistrain, (3) bacterial species in the probiotic, (4) shrimp spp., (5) study duration, (6) stocking density, (7) plastic tank or earthen plastic tank or cage and (8) larval or postlarval stage.

The presence of publication bias was investigated using funnel plots. An adjusted rank correlation test using the Egger method (Egger *et al.* 1997) and the Begg's test (Begg and Mazumdar 1994) was used to assess publication bias. Bias was considered to be present if at least one of the statistical

methods was significant ($P < 0.10$). If there was any evidence of publication bias, from either the statistical tests or the funnel plot, the “trim-and-fill” method (Duval and Tweedie 2000) was used to estimate the quantity and magnitude of missing studies and resultant unbiased effect size.

Results

Overview of included studies

The literature search yielded 220 scientific articles on probiotics evaluation in shrimp. Thirty-five, 21 and 19 articles fulfilled inclusion criteria previously established for survival, SGR and FCR as outcomes, respectively (Figure 1). The majority of the studies were low on all examined items of the Cochrane risk of bias tool except for publication bias, where positive effect of the probiotics were declared in the survival (82.9%), FCR (94.4%), SGR (90.5%) studies. The randomized experiments were stated in 31 from the total of 39 articles included in the meta-analysis.

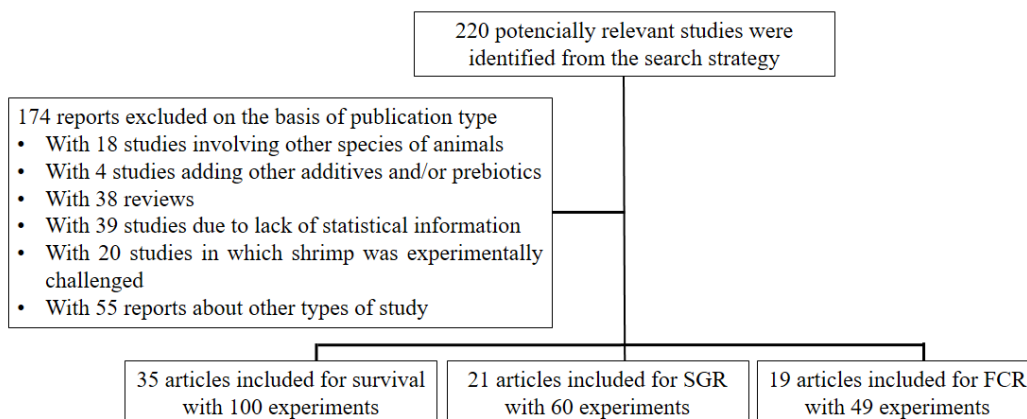


Figure 1. Flowchart on selection of probiotic studies in shrimp for meta-analysis study.

The stocking density per volume was variable, with 44 experiments including up to 500 animals/m³ and 29 experiments with more than 500 animals/m³. Shrimp species studies were *L. vannamei* (22), *P. monodon* (7), *P. latissulcatus* (2), *F. indicus* (2), *L. stylirostris* (1) and *F. chinensis* (1). Only five experiments included shrimp larvae (5). Twenty studies used monostrain inoculum and the

remaining 15 studies used multistrain inoculum. *Bacillus* species and LAB were most frequent strains used with 21 and 9 studies, respectively. Probiotics were administrated via feed (25) or water (10). Twenty-five studies were conducted for >30 days and 10 studies ≤30 days.

Litopenaeus vannamei was the most frequent (17) species in the experiments where specific growth rate were performed. Ten studies used multistrain inoculum whereas 11 used monostrain inoculum. Most studies preferred *Bacillus* species (11) or LAB (6) as probiotic strain. Only postlarvae stages were part of these studies. Eighteen studies included up to 500 animals/m³ and only 3 more than 500 animals/m³. The main way of probiotics administration was as feed additives (16) whereas only 5 studies used the probiotics addition directly to water. Studies were carried out lasting ≤ 30 (4) or >30 days (17).

For feed conversion ratio fifteen articles used *L. vannamei*, 2 studies *P. monodon* and 2 studies *P. latisulcatus*. Seven studies used multistrain inoculum and 12 used monostrain inoculum to investigate probiotic effects. All selected experiments used postlarvae. Probiotic impact of Gram-positive bacteria like *Bacillus* spp. (9) and Lactic-acid bacteria (6) was frequently investigated. Fifteen articles provided probiotics with feed and only fourth added probiotics directly into rearing water. Experiments included less than 500 animals/m³ (17) or more than 500 animals/m³ (2). Of the reviewed articles only one lasted less than 30 days.

Excluded studies

Of the 220 articles identified at the beginning of the meta-analysis, 173 were excluded on the basis of publication type (involving other species of animals being mostly *Artemia* sp. and *Macrobrachium* sp.; inclusion of prebiotics, immunostimulants or both in the diets; or reviews; or lack of statistical information for conducting a meta-analysis, Figure 1).

Survival

Of the 35 articles found to satisfy inclusion criteria, 100 experiments were identified in which a probiotic-treated group was compared to a control untreated group with survival as an outcome. The pooled standardized mean difference showed that probiotics increased survival in comparison to controls (SMD = 3.068, 95% CI 2.594 to 3.543; Figure 2) in the random effects model.

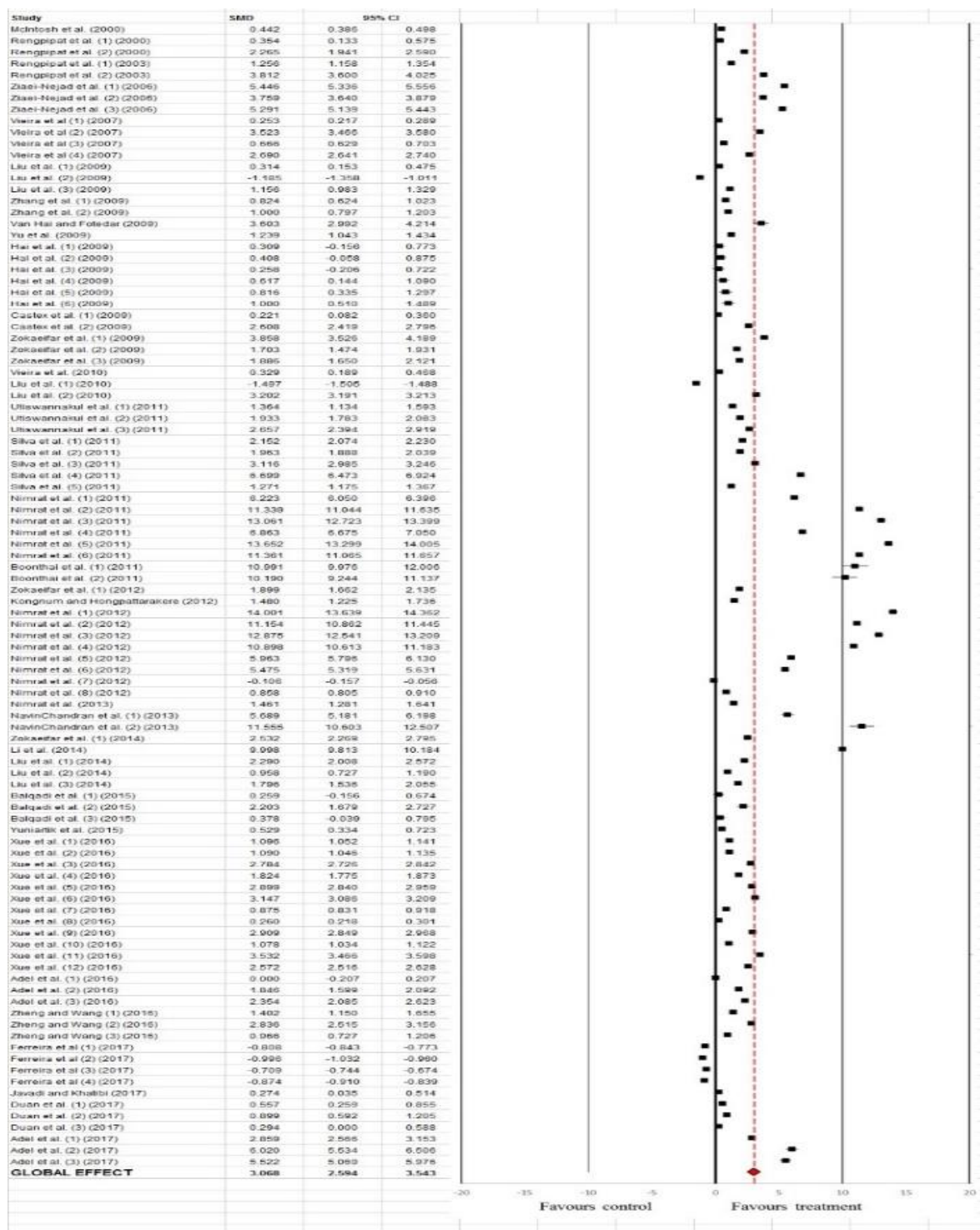


Figure 1. Forest plot of 100 randomized, controlled experiments to study the effect of probiotic supplementation on survival of penaeid shrimps (Standardized mean differences, SMD). Horizontal line in each point represent the 95%CI. Discontinuous line indicates the global effect.

Specific growth rate

From the 21 articles satisfying inclusion criteria, 60 experiments were identified which evaluated probiotic effects on specific growth rate. The global effect of probiotic administration shows an improvement in SGR (SMD = 3.811, 95% CI 3.269 to 4.354; Figure 3).

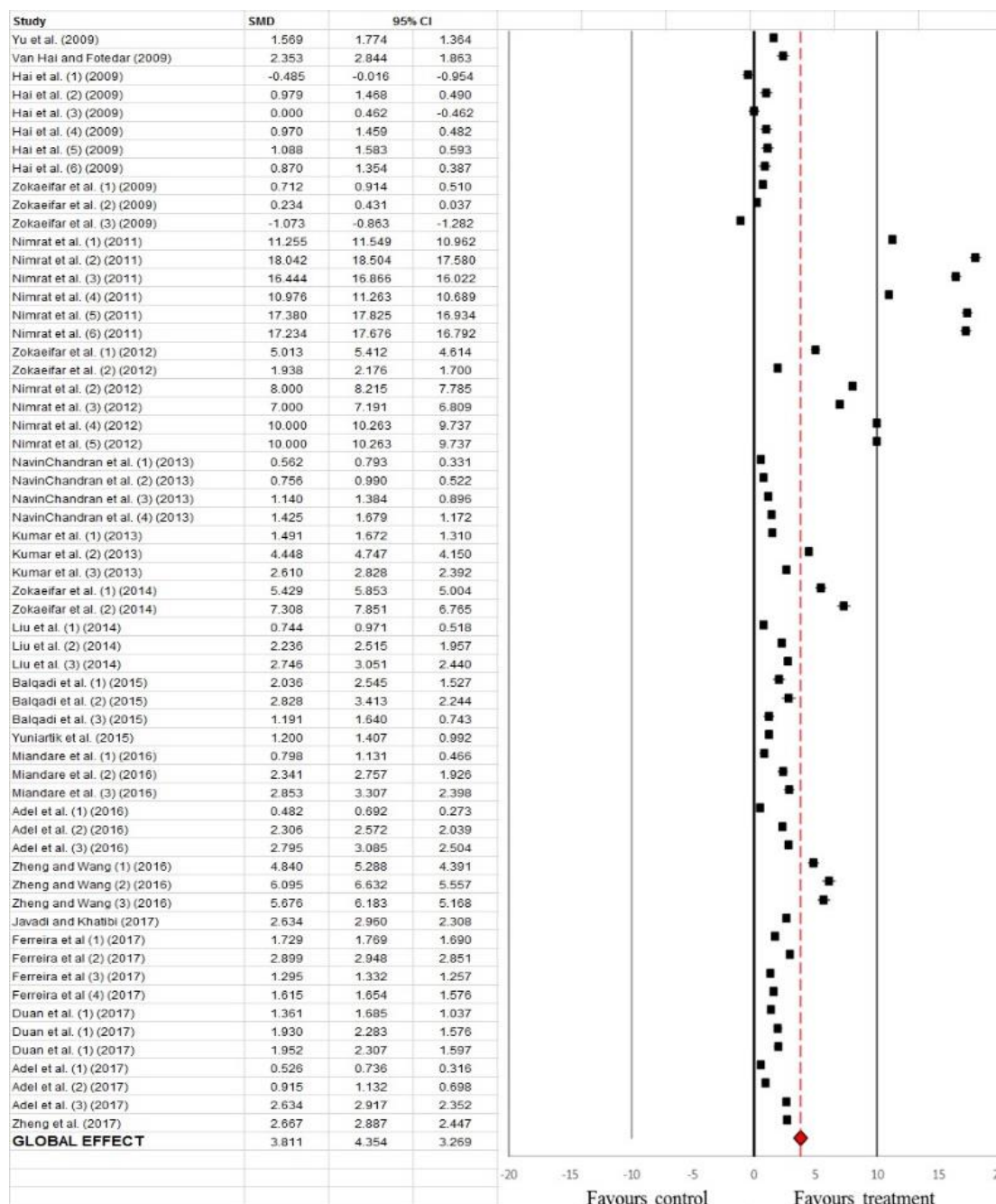


Figure 3. Forest plot of 60 randomized, controlled trials to study the effect of probiotic supplementation on specific growth rate (SGR) of penaeid shrimps (Standardized mean differences, SMD). Horizontal line in each point represent the 95%CI. Discontinuous line indicates the global effect.

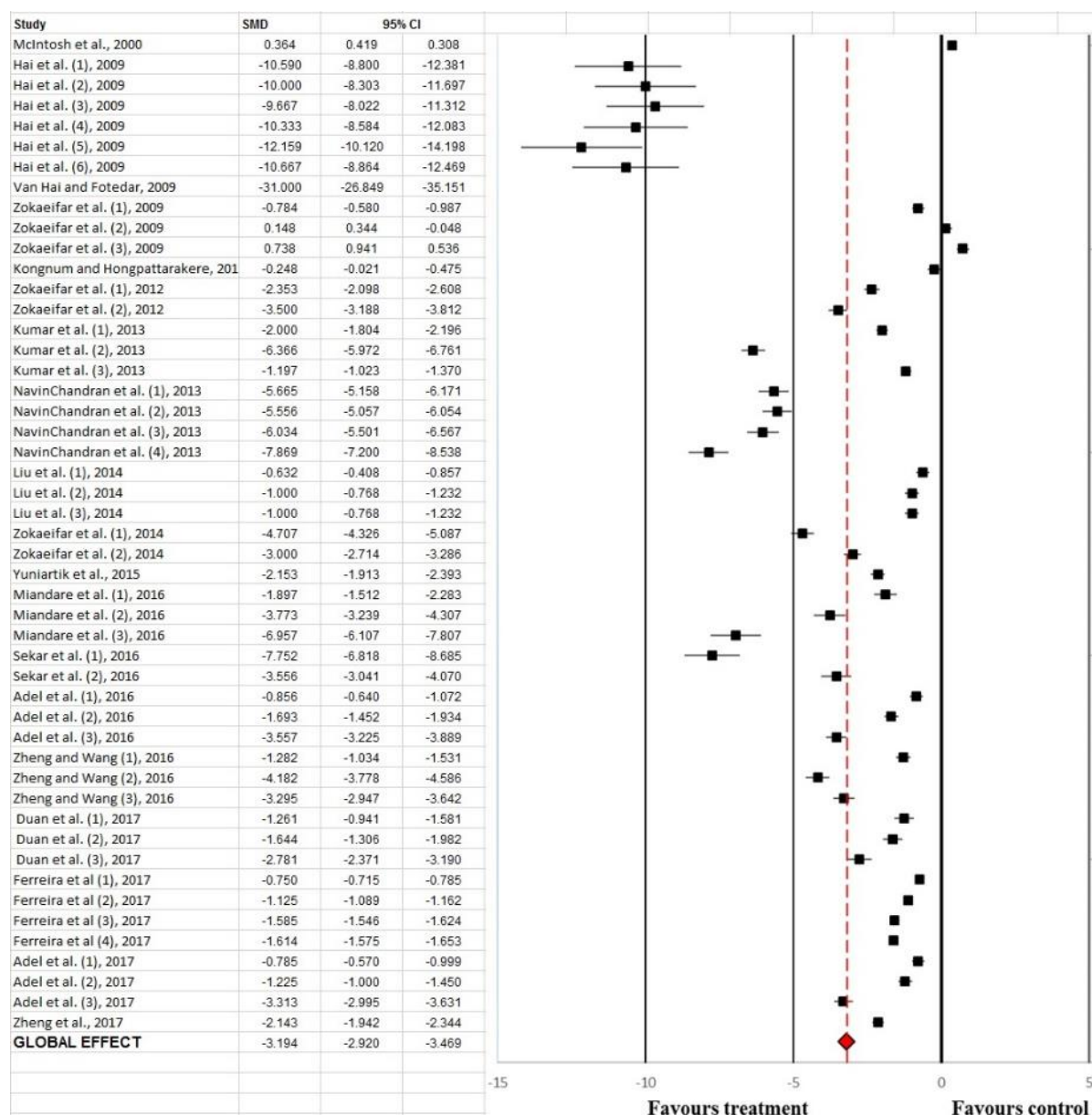


Figure 3. Forest plot of 49 randomized, controlled trials to study the effect of probiotic supplementation on feed conversion ratio (FCR) of penaeid shrimps (Standardized mean differences, SMD). Horizontal line in each point represent the 95%CI. Discontinuous line indicates the global effect.

Feed conversion ratio

Nineteen articles satisfying the inclusion criteria were identified, with forty-nine experiments in which probiotic and untreated groups were compared for feed conversion ratio. FCR improved

when probiotics were supplied, according to the global estimate effect (SMD = -3.194, 95% CI -3.469 to -2.920; Figure 4).

Phenoloxidase

Of the 59 articles included for the phenoloxidase activity, 46 experiments were identified that used prebiotics and 19 probiotics. The difference in combined standardized means showed that immunostimulants increase PO activity compared to controls (Fig. 5). Of the 11 articles included for gene expression in proPO, 10 experiments were identified that used prebiotics and 5 probiotics. The combined standardized mean difference showed that immunostimulants increase proPO compared to controls (Fig. 5). It was possible to verify by a meta-analysis that both phenoloxidase activity and gene expression are stimulated with the supplementation of immunostimulants in penetrated shrimp. Proenzyme had a greater effect concerning the enzyme, this is because the DNA is replicated, transcribed into RNA, which is the expression, and then translated, that is, converted from RNA to protein. It may be that there is a high stimulation of gene expression, but it does not translate, and therefore does not become a protein. Besides, the RNA detection methods are by real-time rt-PCR, from the English reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction in Real-Time, with greater sensitivity because it is fluorometric and the protein is colorimetric.

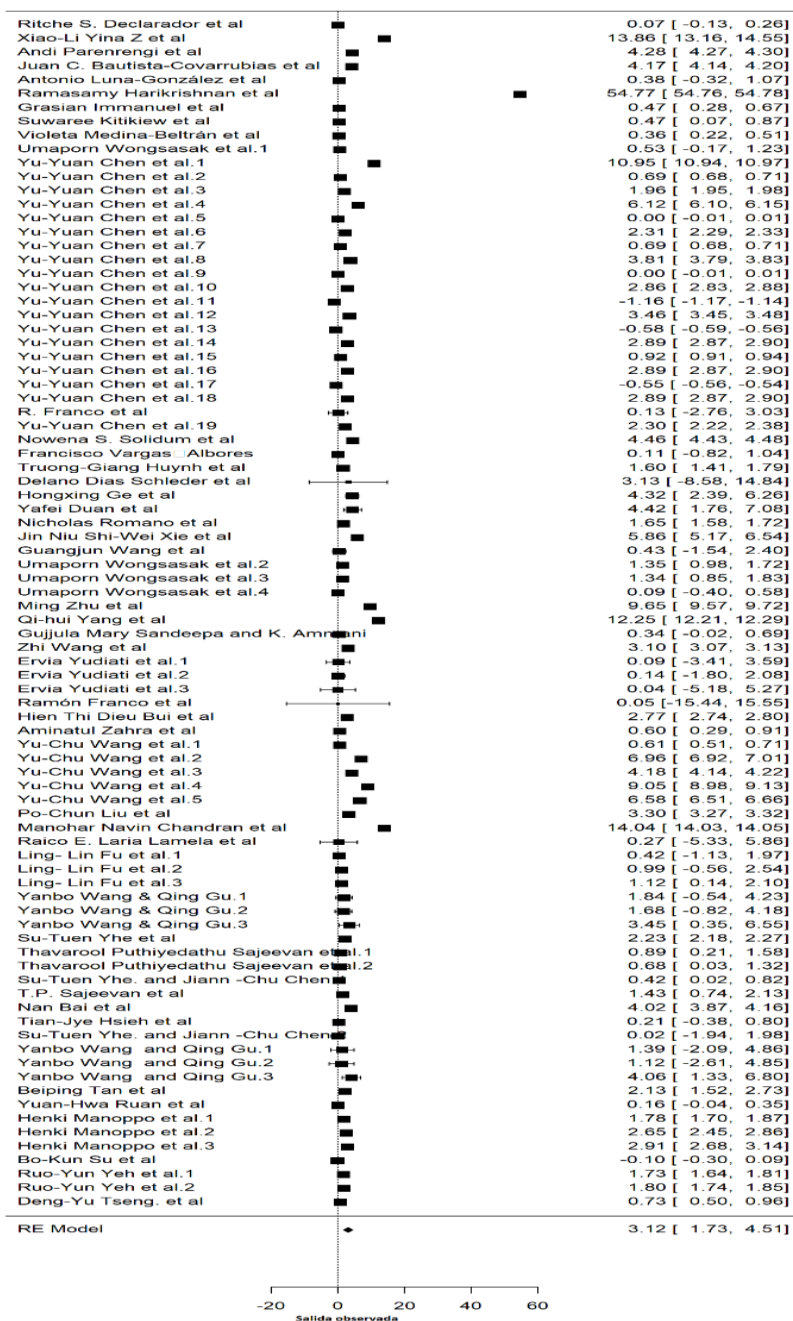


Figure 5. Forest plot of 49 randomized, controlled trials to study the effect of probiotic supplementation on Phenoloxidase activity of penaeid shrimps (Standardized mean differences, SMD). Horizontal line in each point represent the 95%CI. Discontinuous line indicates the global effect.

Discussion

Meta-regression analysis showed that the probiotic effect on survival rate was dependent of the shrimp stage (larvae or postlarvae). Maybe due to the larger number of experiments in postlarval stages. It may be envisaged that probiotics exert a better effect during early life, when a stable gut microflora has not yet been established, when larvae and early post-larval stages are more vulnerable to environmental pathogens. Initial colonization by probiotic organisms can modulate expression of genes in epithelial cells, thus creating a favorable environmental interface for the host (Hooper 2015). Effects on growth performance variables, SGR and FCR, were only evaluated for the post-larval stages. Most of the published literature using probiotics in shrimp culture concerned post-larval stages. This concentration of effort is justified based on the global concern about feed availability, especially for protein sources such as fish meal, and reduction of feeding cost (Troell *et al.* 2014; Rana, Siriwardena, and Hasan 2009). Conversely, little has been investigated on how early probiotic administration could influence further development (Xue *et al.* 2016).

Our observation that probiotic treatment is less effective in earthen containers could be related to the difficulty of exerting control over variables (probiotic access, temperature, dose, farm hygiene). By the other hand, when stocking density increases the positive impact of probiotics on SGR and survival is higher.

Probiotic effect on FCR was impacted by the duration of the experiments as shown by a direct relationship between these variables in the meta-regression analysis. Besides, the low variation among the longer studies evidences that the longer the experimental period the higher the chances of finding true probiotic effects on FCR. In contrast, shorter experiments showed greater effects on SGR. Additionally, this meta-regression analysis revealed an inverse relation between these two variables. In fact, by definition, the relationship between SGR and FCR is proportionally inverse. Probiotic effects on survival were higher in short experiments, but it was only observed in postlarvae stage.

Multistrain probiotics were better for survival and SGR. Commercial probiotics on the market are in most cases comprised of complex mixtures of species or at least strains. This could increase likelihood of gut colonization and host innate immunity stimulation by means of several mechanisms. Multistrain and multi-species probiotics have proven to result in synergistic effect

based on the putative complementary modes of action to enhancing protection (Timmerman *et al.* 2004).

Gram positive bacteria belonging to the LAB group, and *Bacillus* genus, are among the microorganisms most frequently used as probiotics. *Bacillus*-based probiotics showed greater improvement in survival, SGR and FCR of treated shrimps in comparison to LAB. Moreover, the decrease of FCR was similar among these groups. *Bacillus* has been reported as a very versatile genus in relation to the number of mechanisms available for exerting probiotic action, including: antagonistic activity, gut colonization, digestive enzyme secretion, organic waste removal and production of many supplemental nutrients such as biotin, vitamin B12, fatty acids, essential amino acids and other necessary growth factors (Farzanfar 2006; Verschuere *et al.* 2000; Xue *et al.* 2016). Particularly important is the sporulation capacity and high-temperature tolerance which simplifies industrial processes. On the other hand, lactic-acid bacteria are slow growers and could be more sensitive to temperature during pelleting process (Mondet *et al.* 2014; Sosa *et al.* 2016). Besides, bearing in mind cost-effectiveness of any commercial product culturing these anaerobic bacteria may result in more expensive media and equipment.

Probiotic administration via feed was better than via water for all the variables analyzed. Addition of probiotics with feed could be more productive because the probiotic strains can directly modulate digestion and nutrient absorption in the shrimp gut (Chai *et al.* 2016; Van Hai, Buller, and Fotedar 2009). Furthermore, probiotics could serve as a source of nutrients, so direct, concentrated ingestion could be beneficial (Qiu and Davis 2017; Deng *et al.* 2013). This constant oral administration favors microbial colonization, preventing pathogen establishment (Castex, Daniels, and Chim 2014; Luis-Villaseñor *et al.* 2011; Javadi and Khatibi 2017; Sha *et al.* 2016). Another fact is that most of the commercial products available are powders, which increases shelf life and facilitates simultaneous administration of probiotics with other products (Dash *et al.* 2014). Also this alternative provides higher stability through encapsulation, which improves assimilation (Nimrat, Boonthai, and Vuthiphandchai 2011).

Several authors confirm the beneficial effects of probiotics (Zorriehzahra *et al.* 2016) and prebiotics (Dawood, Koshio, and Esteban 2018) in aquaculture. The use of immunoprophylaxis is also proposed as the best alternative for protection against bacterial diseases in shrimp (Ajadi *et al.* 2016), in the same way, it was also proposed as a prophylactic for viruses and fungi (Sivasankar *et al.* 2017).

Action mechanisms

The beneficial effects of Probiotics are through multiple mechanisms, not only on the target organisms, but also on the surrounding environment. The main action mechanisms described for probiotics in aquaculture are, the capacity to colonize and adhere to the intestinal tract, modulation of the immune system, production of beneficial compounds, production of pathogen antagonistic substances, and improvements in the aquatic environment.

Colonization and adhesion in the gastrointestinal tract

The ability of bacteria to adhere and survive in the enteric mucus is pivotal to establish the gastrointestinal microbiota. The adherence capacity is a feature of probiotic and pathogenic bacteria. It is one of the most important criteria for selection and application of probiotic bacteria in aquaculture whereas for the pathogenic bacteria, it is associated with virulence and is considered the first sign of infection (Defoirdt, 2014).

Production of antimicrobial and antiviral compounds

Microorganisms with probiotic activity can also have the capacity to generate extracellular products that inhibit or kill other potentially pathogenic bacteria and virus, such as, antimicrobial substances (Ming *et al.*, 2015).

Production of beneficial compounds

Marine bacteria and yeasts may become important sources of protein to improve the nutritional contribution of certain cultured aquatic species (Achupallas *et al.*, 2015). Similarly, the lipids produced by marine microorganisms have been recommended to improve the nutrition of important aquatic species (Hoseinifar *et al.*, 2016). The production of lipases, chitinases, and proteases by selected microorganisms may contribute to the digestive process of cultured organisms, and have a positive impact on their productive behavior (Shen *et al.*, 2010).

Immunomodulation

The defense against crustacean pathogens is mainly based on innate immunity mechanisms (Song and Li, 2014). The immune system of shrimps involves hemocytes (for encapsulation, nodule formation, and phagocytosis), several plasmatic components (antimicrobial peptides, histones, lysosomal enzymes, lipopolysaccharide binding proteins, and β -1.3 glucans, and recognition molecules), and multimeric systems (coagulation cascade proteins, and the prophenoloxidase system) (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2009).

Conclusions

Probiotic supplementation improves survival, specific growth rate (SGR), feed conversion ratio (FCR) and phenoloxidase activity of Penaeid shrimps. A significant proportion of the evaluated articles lacked proper dispersion measures, or data dispersion was ambiguously stated. In spite of the large number of studies included, we found evidence for publication biases so these results should be interpreted with caution. However, this meta-analysis shows that both the data quality and the approach used were relevant.

Probiotics are involved in the productive parameters of shrimp, such as greater nutrient intake, enhanced immune system, and greater animal survival. Easy handling and safety make probiotic use an increasingly accepted practice; it improves the culture medium conditions and offers advantages for expansion and optimization of sustainable shrimp culture.

References

- Araneda, M., Pérez, E.P., Gasca-Leyva, E. (2008). White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: condition state based on length and weight. *Aquaculture* 283(1-4), 13-18.
- Ajadi, Abdullateef, MY Sabri, Akeem Babatundebc Dauda, MY Ina-Salwany, and AH Hasliza. 2016. Immunoprophylaxis: A better alternative protective measure against shrimp vibriosis—a review. *PJSSR* 2 (2):58-69.
- Begg, C. B., and M. Mazumdar. 1994. Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias. *Biometrics* 50 (4):1088-101.
- Castex, Mathieu, Carly Daniels, and Liet Chim. 2014. *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, edited by D. Merrifield and E. Ringø: JohnWiley & Sons, Ltd.
- Chai, P. C., X. L. Song, G. F. Chen, H. Xu, and J. Huang. 2016. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus* PC465 isolated from the gut of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol* 54:602-11.
- Dash, Gyanaranjan, Ram Prakash Raman, K. Pani Prasad, M. Makesh, M. A. Pradeep, and Swatipriyanka Sen. 2014. Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as feed supplement on host associated microflora, growth, feed efficiency, carcass biochemical composition and immune response of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture* 432:225-236.
- Dawood, Mahmoud AO, Shunsuke Koshio, and Maria Ángeles Esteban. 2018. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture* 10 (4):950-974.
- Decamp, Olivier, David JW Moriarty, and Patrick Lavens. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research* 39 (4):334-338.
- Deng, Deng, Chengfang Mei, Kangsen Mai, Bei-Ping Tan, Qinghui Ai, and Hongming Ma. 2013. Effects of a yeast-based additive on growth and immune responses of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), and aquaculture environment. *Aquaculture Research* 44 (9):1348-1357.
- Duval, S., and R. Tweedie. 2000. Trim and fill: A simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics* 56 (2):455-63.
- Egger, M., G. Davey Smith, M. Schneider, and C. Minder. 1997. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *Bmj* 315 (7109):629-34.
- FAO. *The FAO Capture, Aquaculture and Global production databases have been updated with an additional year and now include data from 1950 to 2015*. 2017 [cited 10/02/2018. Available from <http://www.fao.org/fishery/statistics/en>.
- Farzanfar, Ali. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48:149–158.
- Franco, R, Amílcar Arenal, L Martín, Y Martínez, D Santiesteban, J Sotolongo, E Pimentel, O Carrillo, and Peter Bossier. 2016. *Psychrobacter* sp. 17-1 enhances growth and survival in early postlarvae of white shrimp *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae). *Crustaceana*:1-18.
- Franco, Ramón, Leonardo Martín, Amilcar Arenal, Dayamí Santiesteban, Jorge Sotolongo, Hector Cabrera, Jaime Mejías, George Rodríguez, Angela G. Moreno, Eulogio Pimentel, and Nestor M. Castillo. 2016. Evaluation
- Arenal, A., Toledo, A., Valdes-Vaillant, Y., Mejías-Palmero, J.; Regla López, M., Frizzo, L., Signorini, M., Bossier, P. 2019. Impact of Probiotics on Growth Performance and Immune System: A Meta-Analysis. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), *Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 372-389.

- of two probiotics used during farm production of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Aquaculture Research*:n/a-n/a.
- Glass, Gene V. 1976. Primary, Secondary, and Meta-Analysis of Research. *Educational Researcher* 5 (10):3-8.
- Higgins, Julian PT, and Sally Green. 2011. *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions*. Vol. 4: John Wiley & Sons.
- Hooper, Lora V. 2015. Epithelial cell contributions to intestinal immunity. In *Advances in immunology*: Elsevier.
- Irianto, Agus, and Brian Austin. 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of fish diseases* 25 (11):633-642.
- Javadi, Afshin, and Seyed Amin Khatibi. 2017. Effect of commercial probiotic (Protexin®) on growth, survival and microbial quality of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Nutrition & Food Science* 47 (2).
- Luis-Villasenor, Irasema E, Thelma Castellanos-Cervantes, Bruno Gomez-Gil, Ángel E Carrillo-García, Angel I Campa-Córdova, and Felipe Ascencio. 2013. Probiotics in the intestinal tract of juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: modulation of the bacterial community. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29 (2):257-265.
- Luis-Villaseñor, Irasema E, María E Macías-Rodríguez, Bruno Gómez-Gil, Felipe Ascencio-Valle, and Ángel I Campa-Córdova. 2011. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 321 (1-2):136-144.
- Repeated Author. 2011. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 321 (1):136-144.
- Moher, David, Larissa Shamseer, Mike Clarke, Davina Ghera, Alessandro Liberati, Mark Petticrew, Paul Shekelle, and Lesley A Stewart. 2015. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Systematic reviews* 4 (1):1.
- Mondet, F., J. de Miranda, A. Kretzschmar, Y. Le Conte, and A. Mercer. 2014. On the Front Line: Quantitative Virus Dynamics in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Colonies along a New Expansion Front of the Parasite *Varroa destructor*. *PLoS Pathog* 10 (8).
- Nimrat, Subuntith, Traimat Boonthai, and Verapong Vuthiphandchai. 2011. Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and postlarvae. *Animal Feed Science and Technology* 169 (3-4):244-258.
- Qiu, X, and DA Davis. 2017. Evaluation of flash dried yeast as a nutritional supplement in plant-based practical diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*.
- Rana, K. J., S. Siriwardena, and M. R. Hasan. 2009. Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Sha, Y., M. Liu, B. Wang, K. Jiang, C. Qi, and L. Wang. 2016. Bacterial Population in Intestines of *Litopenaeus vannamei* Fed Different Probiotics or Probiotic Supernatant. *J Microbiol Biotechnol* 26 (10):1736-1745.
- Sivasankar, P, K Riji John, M Rosalind George, SV Anushalini, D Kaviarasu, and M Petchimuthu. 2017. Prophylactics in shrimp aquaculture health management: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5 (4):1049-1055.

- Sosa, N., E. Gerbino, M. A. Golowczyc, C. Schebor, A. Gomez-Zavaglia, and E. E. Tymczyszyn. 2016. Effect of Galacto-Oligosaccharides: Maltodextrin Matrices on the Recovery of *Lactobacillus plantarum* after Spray-Drying. *Front Microbiol* 7:584.
- Timmerman, H. M., C. J. M. Koning, L. Mulder, F. M. Rombouts, and A. C. Beynen. 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics—a comparison of functionality and efficacy. *International journal of food microbiology* 96 (3):219-233.
- Troell, M., R. L. Naylor, M. Metian, M. Beveridge, and P. H. Tyedmers. 2014. Does aquaculture add resilience to the global food system? 111 (37):13257-63.
- Van Hai, Ngo, Nicky Buller, and Ravi Fotedar. 2009. The use of customised probiotics in the cultivation of western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Fish & shellfish immunology* 27 (2):100-104.
- Verschuere, Laurent, Geert Rombaut, Patrick Sorgeloos, and Willy Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (4):655–671.
- Wang, Yanbo, and Qing Gu. 2010. Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response. *Marine Biology Research* 6 (3):327-332.
- Xue, Ming, Chongqing Wen, Huafang Liang, Maohang Ding, Yong Wu, and Xing Li. 2016. In vivo evaluation of the effects of commercial *Bacillus* probiotics on survival and development of *Litopenaeus vannamei* larvae during the early hatchery period. *Aquaculture Research* 47 (5):1661-1669.
- Zorriehzahra, Mohammad Jalil, Somayeh Torabi Delshad, Milad Adel, Ruchi Tiwari, K Karthik, Kuldeep Dhama, and Carlo C Lazado. 2016. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Veterinary Quarterly* 36 (4):228-241.

Avances en la Caracterización y Manipulación de Comunidades Microbianas Asociadas a Biopelículas y Bioflóculos

Luis Rafael Martínez Córdova¹, Kadiya Calderón Alvarado¹, Roberto Carlos Vázquez Euan¹ Ana Lucía Gómez Ramírez¹ y Marcel Martínez Porchas^{*2}

*Autor de correspondencia: marcel@ciad.mx

¹Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora.
Blvd. Luis Donaldo Colosio s/n entre Reforma y Sahuaripa, Hermosillo, Sonora, México

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Km. 1.5, Carretera a La Victoria,
Hermosillo, Sonora, México

Resumen

En este documento se presentan los avances más recientes sobre la caracterización, manejo y aplicaciones de los consorcios microbianos asociados a biopelículas y bioflóculos, así como los efectos en el cultivo de diferentes organismos, especialmente camarones y peces. Se incluyen las experiencias de nuestro grupo de trabajo en los aspectos referidos, en donde podemos destacar la caracterización metagenómica de bioflóculos formados a partir de diferentes sustratos y las propiedades funcionales de los mismos; la caracterización taxonómica y bioquímica de biopelículas formadas sobre diferentes superficies; el efecto de bioflóculos y biopelículas en la respuesta productiva y fisiológica de camarones cultivados intensivamente; el efecto de biopelículas de diferentes condiciones tróficas en la expresión génica de camarones, entre otros. En términos generales se concluye que los consorcios microbianos asociados tanto a biopelículas como a bioflóculos, presentan una amplia diversidad de organismos y que son muy cambiantes de acuerdo al inóculo y condiciones prevalentes, y que por lo tanto pueden ser manipulables para aplicarse a condiciones específicas. Ambos tipos de consorcios tiene efectos benéficos sobre la calidad del agua, la respuesta productiva, la condición fisiológica, la expresión génica y la calidad post-cosecha de los organismos cultivados.

Introducción

El uso de microorganismos benéficos es una práctica ancestral que se ha venido utilizando a través de la historia de la humanidad en diversas actividades productivas tales como panadería, obtención de bebidas con contenido alcohólico, fabricación de productos derivados de la leche (quesos, yogurts etc.), entre otras.

En el ámbito de las ciencias agrícolas y pecuarias, su uso es mucho más reciente y menos generalizado, sobre todo en el caso de la acuicultura. Los primeros reportes en este sentido, son referentes al empleo de diversos microorganismos como probióticos, para mejorar las condiciones de salud de organismos cultivados, así como la calidad del agua y sedimento (Martínez-Cruz *et al.*, 2012).

Sin embargo con los estudios de diversos investigadores sobre todo el Dr. Avnimelech, se ha dado una apertura para el uso de comunidades microbianas como biomasa alimenticia directa, para el cultivo de organismos acuáticos, principalmente de crustáceos y peces (Avnimelech, 1990).

Actualmente muchas de las granjas que cultivan camarones y peces, están utilizando consorcios microbianos para mejorar sustancialmente sus sistemas productivos, especialmente en términos de crecimiento más acelerado, mayores sobrevivencias, organismos más resistentes a enfermedades y con mejor calidad post-cosecha.

Los Consorcios Microbianos

Cuando hablamos de consorcios microbianos, nos estamos refiriendo a un conglomerado de microorganismos de muy diversos grupos, asociados a una matriz que los mantiene unidos y que incluye materiales orgánicos e inorgánicos. Dentro de esta comunidad se dan una gran diversidad de interacciones, algunas de ellas complementarias y otras divergentes, que en suma determinan el efecto del consorcio en la columna de agua, el sedimento, o en el tracto digestivo del organismo que los ingiere.

La comunidad microbiana es muy dinámica y va cambiando rápidamente dependiendo de diversos factores tales como el tiempo, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes

(particularmente la relación C:N), la disponibilidad y tipo de sustrato para adherirse, la luz, la salinidad, el pH, la alcalinidad, entre otros (Martínez-Córdova *et al.* 2016). Estos cambios lógicamente se traducen también en variaciones notables en la composición bioquímica de los consorcios y consecuentemente en su valor nutricional para los organismos que eventualmente los ingieren.

Normalmente los peces y camarones no tienen la capacidad de consumir microorganismos libres en la columna de agua, sobre todo en sus etapas postlarvales; sin embargo la mayoría de ellos pueden hacerlo eficientemente cuando estos microorganismos están inmovilizados en diferentes tipos de sustratos. Cuando el sustrato es fijo, los consorcios asociados son conocidos como biopelículas (biofilms en inglés) o también como perifiton cuando están mayormente formados por organismos vegetales. Cuando el sustrato es flotante, los consorcios son llamados bioflóculos (bioflocs en inglés). Ambos tipos de comunidades son similares en algunos aspectos, pero difieren en otros, como la estabilidad y el tipo de organismos que los pueden consumir. Las biopelículas son mayormente aprovechadas por moluscos gasterópodos (caracoles, abulón, etc.) y algunos crustáceos como camarones. Los bioflóculos son consumidos más eficientemente por peces y camarones.

Los consorcios microbianos pueden formarse sobre muy diversos tipos de materiales tanto naturales como: piedras, raíces, madera, bambú y otros; así como sobre materiales sintéticos: vidrio, plástico, telas diversas, metales y otros. Sin embargo algunos materiales son más adecuados que otros respecto a la facilidad de formación y la estabilidad. Un estudio llevado a cabo en nuestra institución, demostró que materiales plásticos tipo malla, son más adecuados en cuanto a la estabilidad de las películas sobre ellos formados, que otros materiales como madera y tela de yute (Gómez-Ramírez *et al.*, 2019). Para el caso de los bioflóculos, hemos encontrado que las semillas de amaranto, el salvado de avena y el salvado de trigo, son los sustratos flotantes más eficientes (Peiro *et al.*, 2019).

Los primeros colonizadores de un determinado sustrato son normalmente aquellos capaces no solo de adherirse a él, sino de desdoblar los carbohidratos (Martínez-Córdova *et al.* (2016), generando así condiciones para la colonización de otros microorganismos capaces de ligarse a la matriz de exopolisacáridos y metabolizar el nitrógeno y el carbono de la columna de

agua, en tanto sean compatibles con las condiciones de la misma. Subsecuentemente su perfil taxonómico irá cambiando hasta alcanzar una estabilidad funcional que es cuando se considera que el consorcio (bioflóculo o biopelícula) está maduro.

La conformación trófica de los consorcios puede ser muy variable y manipulable de acuerdo al inóculo inicial que se apliquen y las condiciones en que se lleve a cabo la maduración. Para la formación de consorcios basados mayormente en organismos foto-autotróficos, se inocula al inicio una o más microalgas bentónicas, que van a conformar una biopelícula que posteriormente irá siendo colonizada por otros microorganismos e inclusive por metazoarios. Para la formación de consorcios basados mayormente en organismos heterotróficos, el inóculo inicial consiste en bacterias heterotróficas, aunque posteriormente pueden agregarse organismos autotróficos. En los estudios que hemos realizado en nuestra institución, los inóculos que mejores resultados han dado para consorcios autotróficos son las microalgas bentónicas *Navicula incerta* y *Navicula* sp., con las que se lograron biopelículas bien estables y con una adecuada composición bioquímica como alimento de camarón (Gómez-Ramírez *et al.* 2019).

Rutas Metabólicas

Los consorcios microbianos asociados a bioflóculos o biopelículas tienen múltiples rutas metabólicas para procesar el nitrógeno y el carbono, lo cual facilita su adaptación a diferentes tipos de sustratos y superficies. Vargas-Albores *et al.* (2019) reportaron evidencias de metabolismos de metano (RuMP y Serine pathways) y nitrógeno (vía fijación, denitrificación, nitrificación, and detoxificación) en bioflóculos producidos con amaranto o trigo como sustratos flotantes. La fijación del CO₂ fue también detectada, incluyendo rutas metabólicas como las del ciclo de Calvin; sin embargo, otras rutas metabólicas como el ciclo reductivo del ácido cítrico, el ciclo dicarboxilato-hidrobutirato, 3-hydroxypropionato-biciclo and y la ruta de Wood-Ljungdahl, fueron también detectados. La presencia de taxones particulares y de funciones, depende de las condiciones prevalentes en cada sistema, incluyendo cada uno de los parámetros anteriormente mencionados.

Caracterización de Consorcios Microbianos

Martínez, R., Morales, A., Herrera, F., González, O., Hernández, L., Vinjoy, M., Cabrera, H., Lowery, Y., Perez, L., Estrada, M.P. 2019. Empleo de Suplementos Nutricionales en Larvas de Peces y Crustáceos, Acuabio V Caso Específico. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 390-409.

La caracterización taxonómica y funcional de consorcios microbianos es actualmente posible gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación. Aunque existen varios genes considerados como marcadores taxonómicos, el más utilizado es el gen ribosomal 16S (16S-ARNr). Éste es un componente de la subunidad menor (30S) de los ribosomas procariotas y se utiliza para la reconstrucción de filogenias debido a su baja tasa de evolución y a las regiones variables que posee (Ortiz-Estrada *et al.* 2017). Además, las bases de datos más robustas con las de 16S-ARNr, tales como RDP (Ribosomal Database Project), SILVA, Greengenes, entre otras.

Esta aproximación ha sido útil para estudiar de manera más profunda a los consorcios microbianos que constituyen a los bioflóculos y biopelículas. Incluso, ha sido posible predecir las funciones presentes en estos consorcios, llevando a cabo una reconstrucción filogenética y tomando como referencia el genoma del pariente más cercano (Zaneveld *et al.* 2013). Por ejemplo, Garibay-Valdez *et al.* (2019) reportaron los cambios causados en la microbiota intestinal del camarón blanco (*L. vannamei*) a causa del consumo de biopelículas autotróficas; sin embargo, las funciones predichas de estos mismos datos revelaron que el potencial funcional de la microbiota se mantenía similar durante el desarrollo del camarón, con lo cual se demostró que el hospedero trata de mantener una redundancia funcional de su microbiota. Existen sin embargo, aproximaciones que ofrecen mayor certidumbre para conocer el perfil taxonómico y funcional de un consorcio microbiano, incluyendo la metagenómica (secuenciación escopeta; shotgun) que ofrece un panorama más detallado acerca de las funciones potenciales; la metatranscriptómica, que revela cuales funciones están siendo ejercidas por un consorcio microbiano en un determinado momento; la metaproteómica, que teóricamente considera todas las proteínas recuperadas directamente de fuentes ambientales y se usa para clasificar y complementar con todos los genes identificados de comunidades complejas, donde los individuos no pueden agruparse en especies u organismos.

La siguiente figura presenta el resultado de una caracterización metagenómica de bioflóculos suplementados con probióticos comerciales y no comerciales (Huerta-Rabago *et al.* 2019)

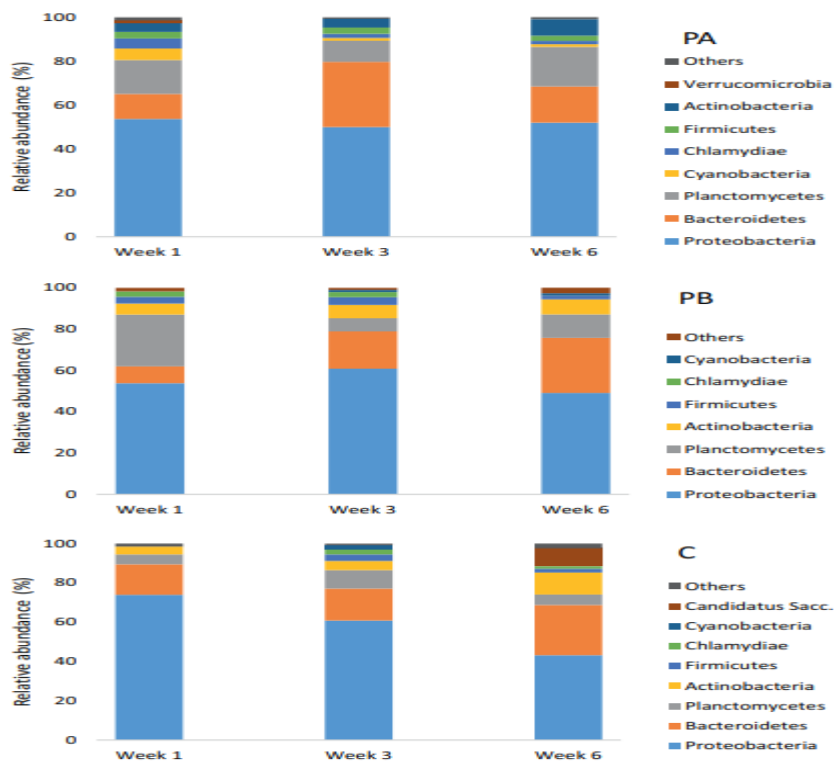


Figura 1. Caracterización de microorganismos en bioflóculos suplementados con probióticos comerciales y no comerciales por medio de metagenómica.

También se tiene resultados para el caso del camarón, en estudios llevados a cabo dentro de nuestro grupo (Garibay *et al*, 2019)

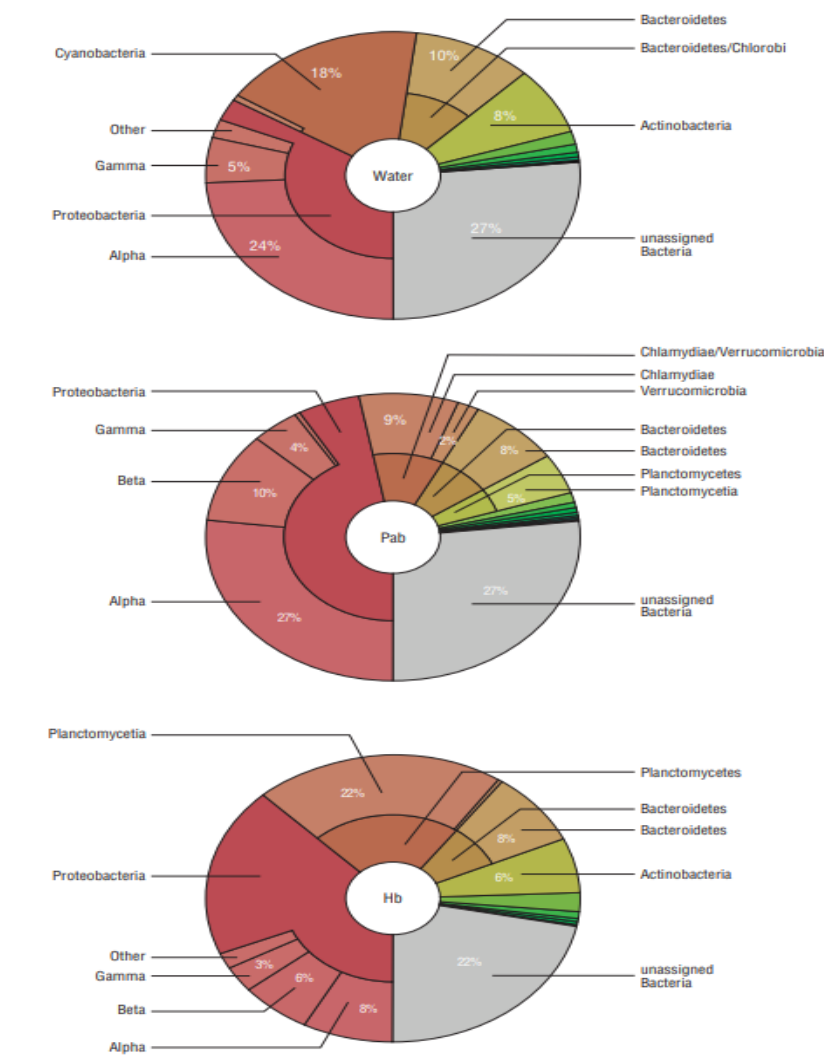


Figura 2. Caracterización de microorganismos en agua y en biopelículas foto-autotróficas y heterotróficas, por medio de metagenómica.

Efectos Principales en la Calidad del Agua

Los principales efectos de los consorcios microbianos sobre la calidad del agua, son aquellos relacionados con el consumo o transformación de metabolitos nitrogenados como N, NAT, NO₂ y NO₃, así como con la degradación de la materia orgánica y la producción y transformación de metano y ácido sulfhídrico. Bernardes Martins *et al* (2018) reportan que el amonio y nitritos, disminuyen significativamente en sistemas de cultivo de tilapias con bioflocs y que la disminución está relacionada al pH. (Figura 1)

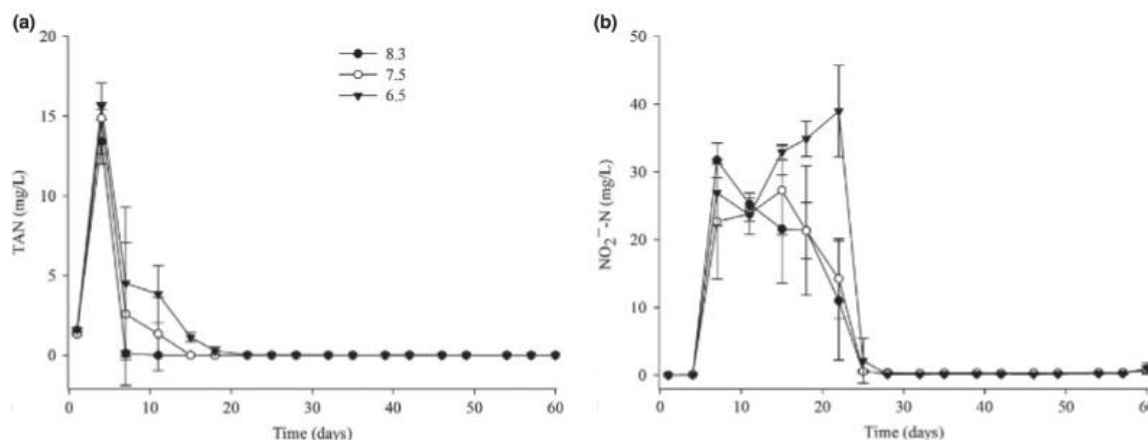


Figura 3. Dinámica del NAT y NO₂ en un sistema de bioflóculos para tilapia a diferentes pH (Tomada de Bernardes Martins *et al.* 2019).

En el mismo sentido, Wang *et al.* (2019) probaron diferentes proporciones de C:N para la formación de bioflóculos y ver el efecto en la remoción de NAT y nitritos, encontrando que a mayor proporción, la remoción de ambos componentes fue mayor (Figura 3)

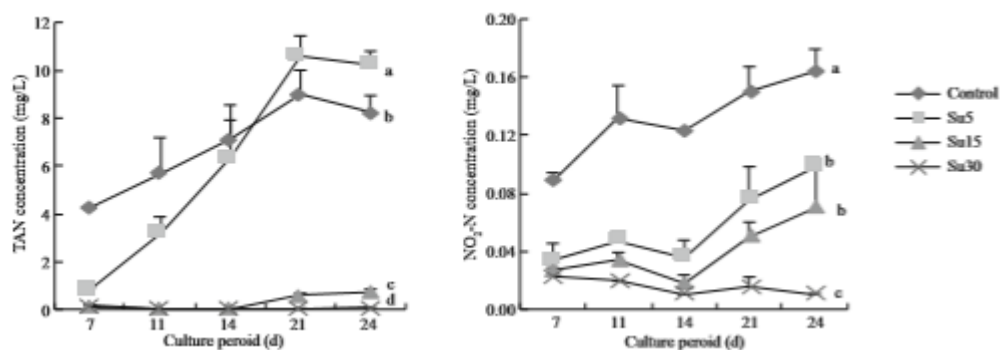


Figura 4. Remoción de NAT y NO₂ en bioflóculos con diferente proporción C:N

Estudios realizados en nuestra institución han demostrado también la eficiencia tanto de los bioflóculos como de las biopelículas en la remoción o transformación de compuestos nitrogenados, principalmente por el proceso de nitrificación

Gómez Ramírez *et al* (2019, en revisión), reportan la dinámica de los compuestos nitrogenados y fosfatos en un sistema de cultivo de camarón utilizando biopelículas formadas con microalgas y con microalgas y bacterias (Figura 5).

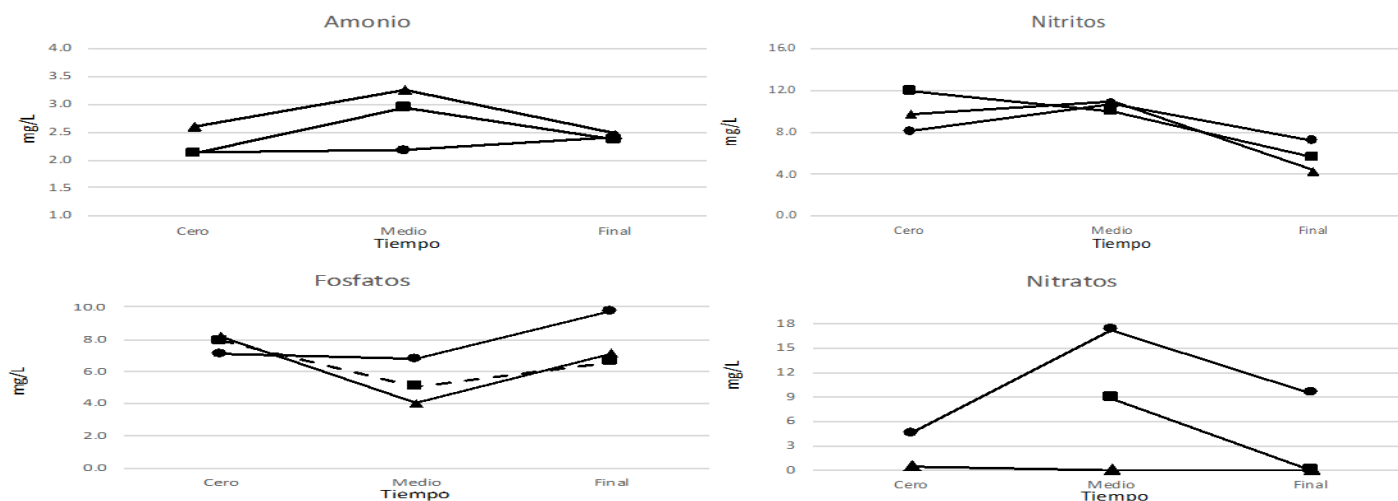
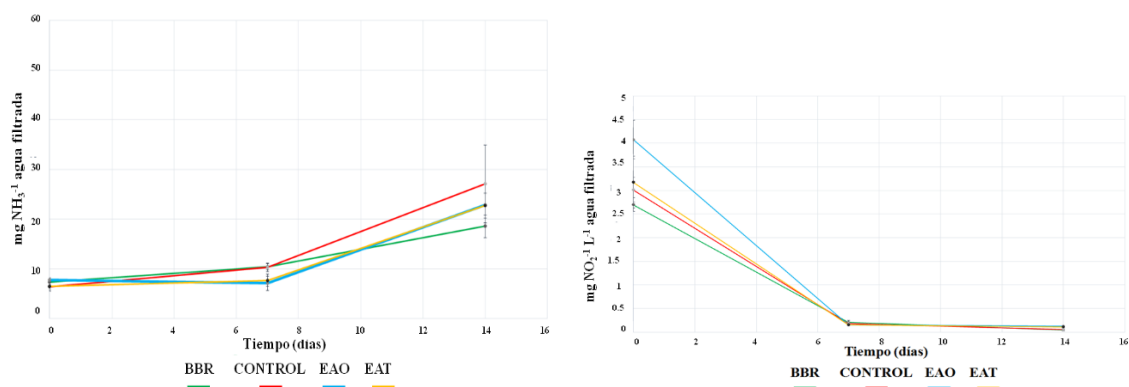


Figura 5. Dinámica de compuestos nitrogenados y fósforo en sistemas con biopelículas de microalgas (), microalgas/bacterias () y un control ().

Fuerte Alvarado (2018) estudió los cambios temporales ocurridos en la diversidad microbiana del intestino de camarones (*L.vannamei*) sanos, antes y después de ser alimentados con tres dietas distintas y complementadas con bioflóculos, en comparación con un control. Se analizó la comunidad microbiana presente en el bioflóculo, y en la columna de agua y se llevaron a cabo análisis de compuestos nitrogenados en el agua (Figura 6).



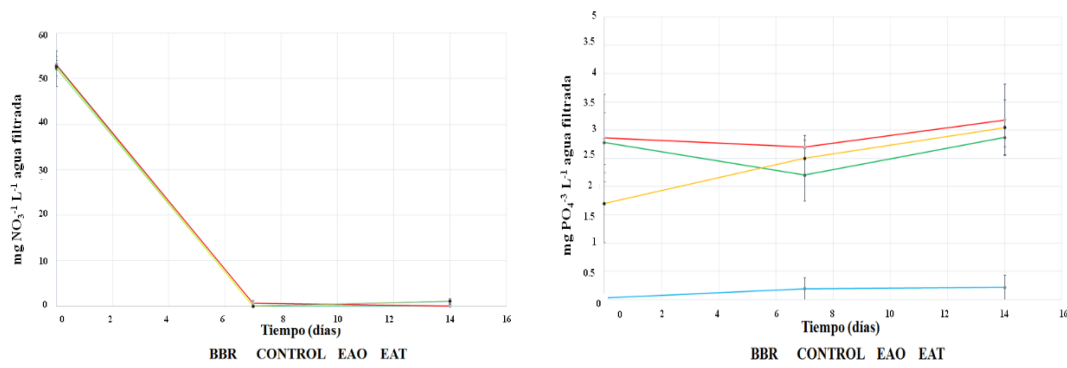


Figura 6. Concentración de componentes nitrogenados y fosfatos en el cultivo

Contrariamente a lo esperado las dietas disminuyeron nitritos y nitratos y aumentaron NAT. Sin embargo los valores en donde se utilizaron bioflóculos fueron menores que el control. Respecto a la diversidad microbiana encontrada en los bioflóculos, se observó una diferencia significativa respecto a Bacteroidetes respecto al control (Figura 7).

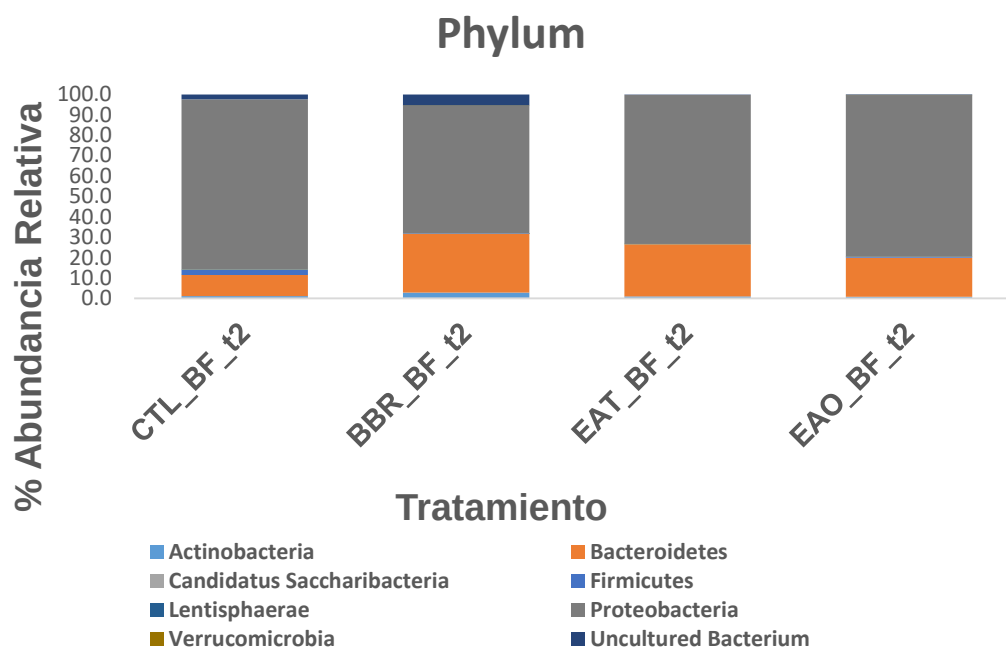


Fig 7. Abundancia relativa de las 8 clases encontradas en función del tratamiento aplicado en las muestras de bioflóculo al final del bioensayo (T2).

Nguyen *et al.* (2019) probaron la remoción de sólidos suspendidos totales y de nutrientes en un sistema con bioflóculos formados por microalgas y bacterias a diferentes concentraciones, encontrando porcentajes de remoción de hasta 88 % (Figura 8)

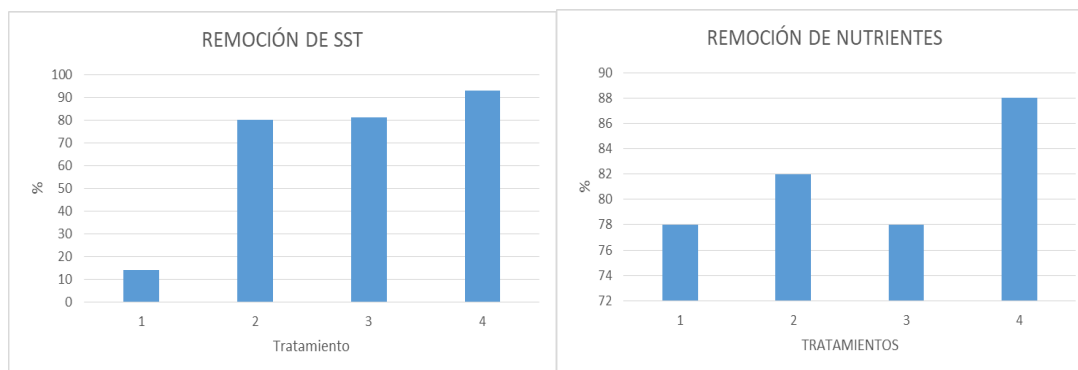


Figura 8. Remoción de sólidos suspendidos totales y nutrientes en un sistema de bioflóculos con microalgas y bacterias a diferentes concentraciones.

En nuestro grupo de trabajo hemos también utilizado bioflóculos mixotróficos formados con microalgas bentónicas y bacterias probióticas, los cuales mostraron igualmente una buena capacidad de remoción de compuestos nitrogenados (Gómez-Ramírez, enviado).

Efectos en la Respuesta Productiva

Existen múltiples investigaciones sobre el efecto del uso de bioflóculos (y en menor medida de biopelículas) en la respuesta productiva de organismos cultivados, mayormente crustáceos y peces. Algunas de las más recientes se presentan a continuación.

Guemez-Sorhouet *et al.* (2019) evaluaron el efecto de tres sistemas: agua clara, bioflocs y bioflocs más sustratos artificiales (biopelículas), sobre el desempeño productivo de *L. vannamei*, en la fase de maternización, cultivado a densidades de 300, 600 y 900 org/m³. Los resultados mostraron que en términos generales el crecimiento fue mejor a más bajas densidades y ligeramente mejor con el uso de bioflóculos o bioflóculos y biopelículas, en comparación con el control (Figura 9).

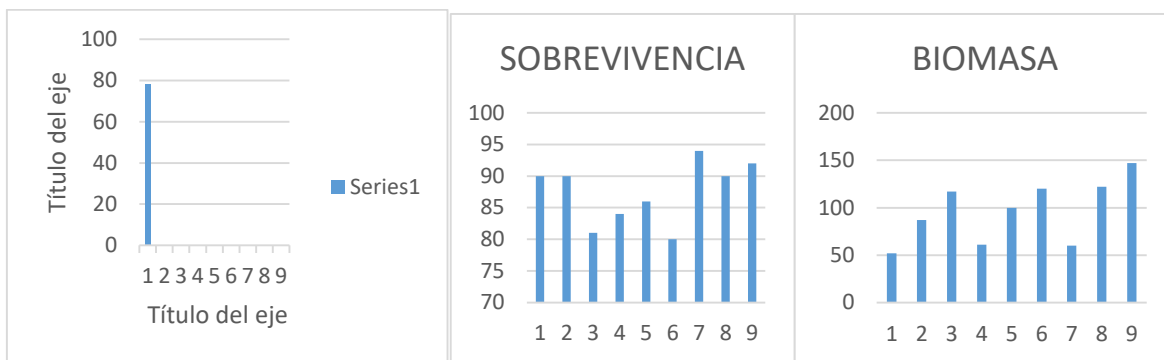


Figura 9. Crecimiento (g/semana), sobrevivencia (%) y biomasa (Kg) de *L. vannamei* cultivado en agua clara (1, 2 y 3), con bioflocs (4, 5 y 6) y con bioflocs y sustratos (7, 8 y 9), a densidades de 300 (1, 4 y 7), 600 (2, 5 y 8) y 900 (3, 6, 9) organismos/m³. (Tomada de Guemez-Sorhouet *et al.* 2019).

La sobrevivencia igualmente mostró ser mejor a densidades más bajas, pero en el sistema con bioflocs y sustratos se obtuvieron los mejores valores (Figura 5)

Respecto a la biomasa final obtenida, los mejores resultados se presentaron lógicamente a mayor densidad, pero fueron más altos en el sistema con bioflocs y sustratos, seguido del sistema con solo bioflocs y finalmente el control (Figura 6)

El FCA no observó un patrón definido tal como se presenta en la figura 7. En general los valores menores se presentaron a las densidades medias, pero no se observa un efecto de bioflóculos o sustratos en este parámetro, contrariamente a lo que otros investigadores y nuestro grupo han encontrado.

Por ejemplo Peiro *et al.* (2019 En prensa), reportan un FCA mucho más bajo en sistemas con bioflóculos utilizando salvado de avena como nucleador, en comparación con un cultivo sin bioflóculos (Tabla 1)

Tabla 1. Parámetros de producción de *L. vannamei* en pre-engorda en sistemas con bioflóculos utilizando como nucleadores salvado de trigo (ST), Semillas de amaranto (SAm) y Salvado de avena (SAv), en comparación con un control sin bioflóculos (C)

Treatment	Final Weight (g)	SGR %/day	Survival (%)	FCR
ST	1.28±0.15 ^{ab}	6.20±0.31 ^b	95.3±4.8a	1.06±0.09 ^b
SAm	1.29±0.10 ^b	6.24±0.20 ^b	93.7±6.0a	1.06±0.08 ^b
SAv	1.38±0.04 ^b	6.43±0.08 ^b	98.8±2.0a	0.92±0.05 ^a
C	1.10±0.01 ^a	5.83±0.03 ^a	98.5±1.5a	1.20±0.02 ^c

En otro estudio, Vázquez Euan *et al.* (2019 en prensa), se encontró que sin importar el origen de la biopelícula, la sobrevivencia, crecimiento, biomasa final y FCA de camarón, *L. vannamei*, fue mejor comparada con un grupo control, que no incluyo ningún tipo de biopelícula (Tabla 2).

Tabla 2. Respuesta productiva de *L. vannamei* cultivado en presencia de tres tipos de biopelículas: biopelícula de consorcio microbiano inespecífico de origen marino (BMC), biopelícula de diatomea *Navicula incerta* (BFA) y biopelícula de probiótico comercial (BPC)

Parámetros	Control	BMC	BFA	BPC
Peso inicial (g)	6.10 ± 0.3 ^{ab}	6.32 ± 0.06 ^a	6.08 ± 0.17 ^{ab}	5.34 ± 0.72 ^b
Peso final (g)	9.44 ± 0.84 ^a	11.93 ± 0.56 ^a	10.57 ± 1 ^a	9.40 ± 0.99 ^a
Peso ganado (g)	3.31 ± 0.54 ^a	5.60 ± 0.52 ^a	4.42 ± 0.89 ^a	4.00 ± 0.81 ^a
Biomasa ganada (%)	8.69 ± 5.79 ^a	58.28 ± 8.05 ^b	60.21 ± 15.29 ^b	58.04 ± 14.84 ^b
FCA*	2.21 ± 0.66 ^a	1.60 ± 0.16 ^a	1.60 ± 0.41 ^a	1.86 ± 0.54 ^a
Sobrevivencia (%)	68.68 ± 17.32 ^a	77.47 ± 2.5 ^a	85.80 ± 14.43 ^a	87.93 ± 10.40 ^a

* Factor de conversión alimenticia

Martínez, R., Morales, A., Herrera, F., González, O., Hernández, L., Vinjoy, M., Cabrera, H., Lowery, Y., Perez, L., Estrada, M.P. 2019. Empleo de Suplementos Nutricionales en Larvas de Peces y Crustáceos, Acuabio V Caso Específico. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisiones en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 390-409.

Efectos en la Condición Fisiológica y Estado Inmune

Algunos estudios recientes se han enfocado a evaluar el efecto de consorcios microbianos sobre la condición fisiológica y estado inmune de organismos cultivados. Xu and Pan (2013), probaron dos proporciones de C:N (15 y 20) en un sistema de cultivo con bioflóculos para camarón y evaluaron su efecto en la condición fisiológica e inmune, encontrando que los hemocitos totales, la actividad fagocítica, antibacteriana y bacteriolítica, fue mayor en los sistemas con biofloc (sobre todo con un C:N de 20), en comparación con el control (Figura 10).

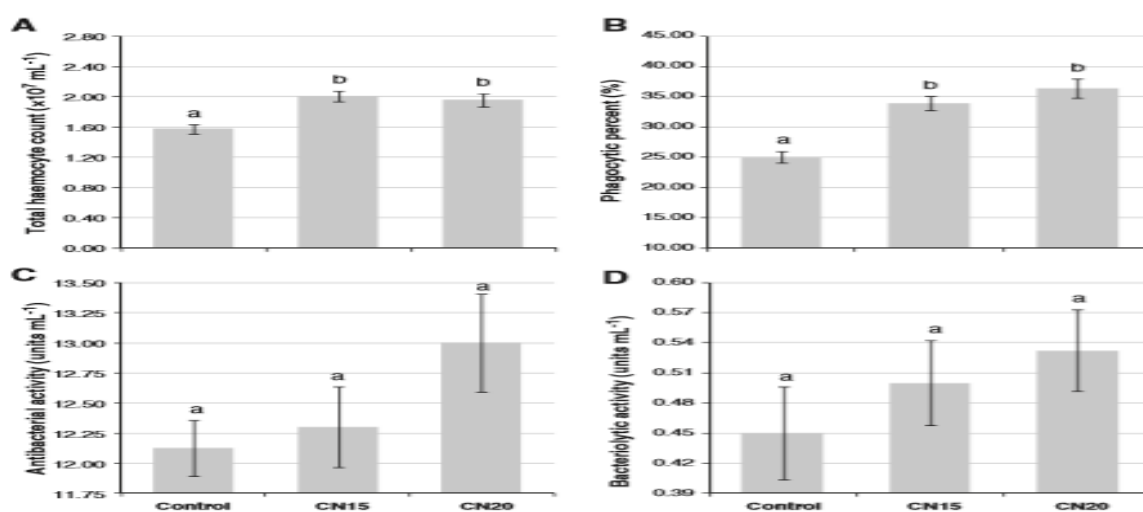


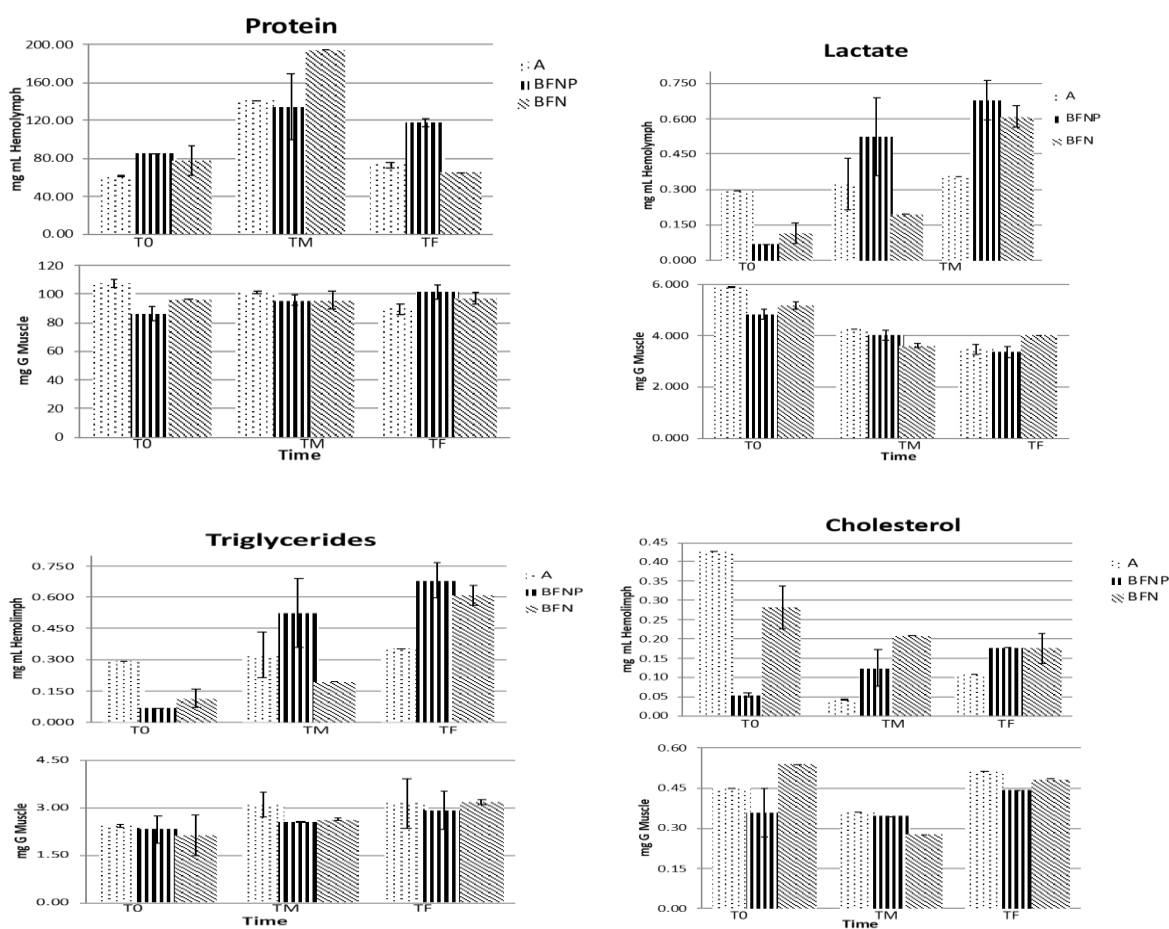
Figura 10. Condición fisiológica y estado inmune de camarón en sistemas de bioflóculos y diferentes proporciones C:N. (Tomada de Xu and Pan, 2019)

También nuestro grupo de trabajo ha constatado el efecto de los consorcios microbianos en la condición fisiológica y estado inmune de camarones en cultivo. Becerra-Dorame *et al.* (2014) probaron el efecto de consorcios microbianos asociados a biopelículas y bioflóculos basados en organismos autotróficos y heterotróficos sobre varios metabolitos hemolinfáticos indicadores de condición fisiológica e inmune del camarón durante su pre-engorda y encontraron que fueron mejores en los tratamientos con la inclusión de consorcios, respecto al control, pero en algunos aspectos fueron aún mejores en aquéllos basados en organismos autotróficos (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto consorcios microbianos asociados a biopelículas y bioflóculos basados en organismos autotróficos y heterotróficos en parámetros hemáticos (mg mL⁻¹) de *L. vannamei*.

	Proteína	Glucosa	Colesterol	Acilglicéridos	Lactato	SOD
Control	75.06	0.18	0.20	0.10	0.08	16.4
Autotrófico	130.0	0.28	0.33	0.18	0.05	27.3
Heterotrófico	93.7	0.34	0.24	0.35	0.05	50.0

En el mismo sentido, Gómez-Ramírez *et al.* (2019 en revisión) reportan los siguientes resultados para la evaluación de metabolitos hemáticos en camarones alimentados con biopelículas foto-autotróficas y mixotróficas (microalgas-bacterias probióticas) (Figura 11).



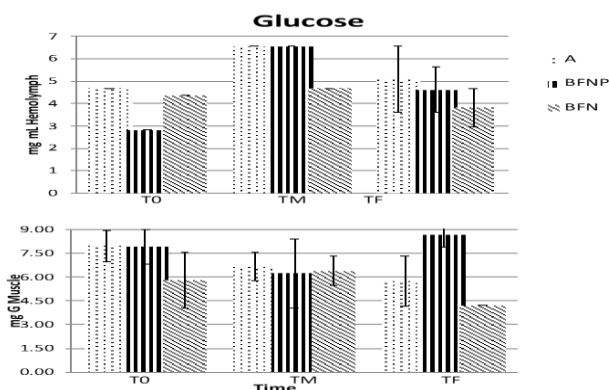


Figura 11. Metabolitos hemáticos en camarones alimentados con biopelículas de microalgas (BFN); microalgas/bacterias (BFNP) y control (A).

Efectos en la Expresión de Genes de Importancia Acuícola

Se encuentran en la literatura diversos estudios sobre el efecto del consumo de consorcios microbianos asociados a bioflóculos o biopelículas, sobre la expresión de genes de interés en diversos organismos de importancia acuícola.

Los cambios en la condición fisiológica y el estado inmune de los camarones en sistemas de cultivo con bioflóculos y/o biopelículas pueden ser evaluados en el nivel más temprano de respuesta de los seres vivos, es decir, en la expresión de los genes relacionados con las rutas metabólicas que son afectadas por el ambiente y la alimentación, como, por ejemplo, el sistema inmune y el sistema digestivo. Al respecto, son numerosos los trabajos de investigación que han demostrado que por medio de la manipulación de los consorcios microbianos que conforman los bioflóculos y/o biopelículas, ya sea por el origen de los mismos, por las proporciones de carbono/nitrógeno, el uso de diferentes suplementos alimenticios, fuentes de carbono, salinidad, etc. es posible aumentar la expresión de genes claves que pueden incrementar el aprovechamiento del alimento, la talla y el peso, la supervivencia y resistencia a patógenos (Crab *et al.*, 2012; Ekasari *et al.*, 2014; Kin *et al.*, 2014; 2015; Cardona *et al.*, 2015). Kheti *et al.*, (2017), reportan que el consumo de bioflóculos activó la respuesta inmune, le expresión de genes relevantes al estado inmune y la resistencia a enfermedades del rohu, *Labeo rohita*.

En nuestro grupo de trabajo evaluamos el efecto en la respuesta productiva, sobrevivencia y la expresión de los genes del sistema inmune, antioxidante y digestivo; profenol-oxidasa (proPO), catalasa, tripsina y quimotripsina, respectivamente, de tres tipos de biopelículas formadas con microorganismos heterotróficos o autotróficos de distinto origen; una con un consorcio de microorganismos marinos, otra con microalgas diatomeas *Navícula incerta* y otra con microorganismos de un probiótico comercial.

La expresión relativa de los genes *proPO*, catalasa, tripsina y quimotripsina se analizó por PCR en tiempo real en el hepatopáncreas de camarones que fueron alimentados con los tres tratamientos con biopelículas (BFA, BCM y BPC) y un control sin biopelícula. En la figura 9 se puede observar que, aunque en la mayoría de los casos no hubo una diferencia significativa entre la expresión relativa de los cuatro genes en los tratamientos con biopelículas, si se encontraron diferencias con respecto a la expresión detectada en el grupo control (Figura 12).

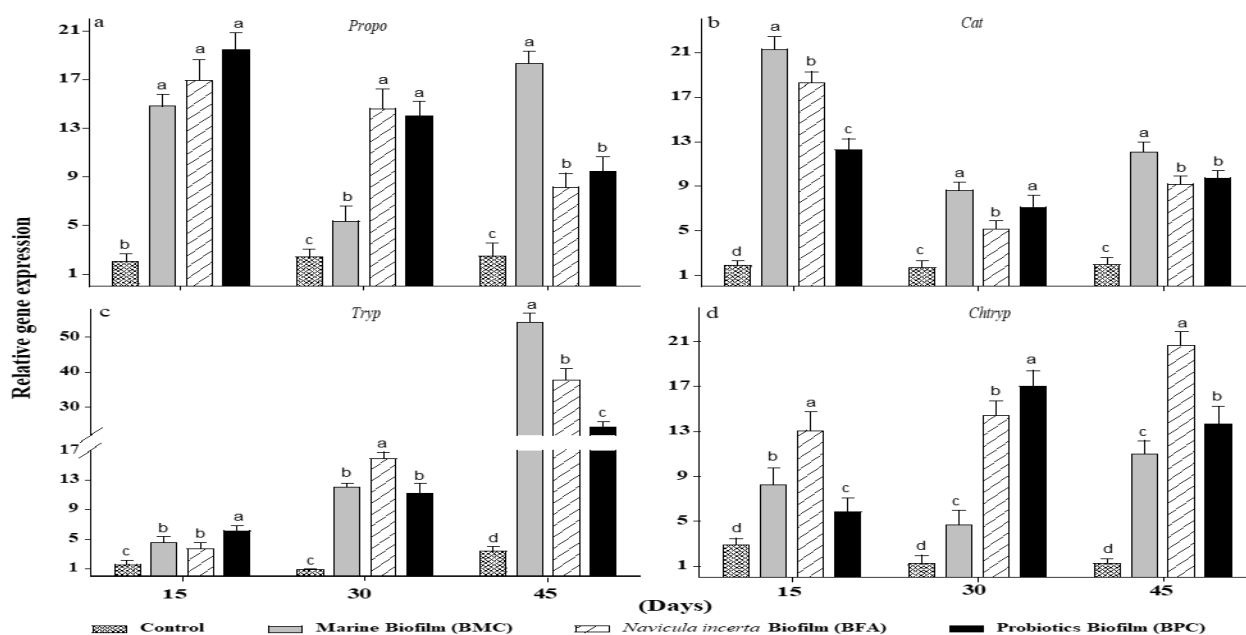


Figura 12. Expresión relativa de los genes proPO (a), Catalasa (b), tripsina (c) y quimotripsina (d) en hepatocitos de camarón cultivados con las diferentes biopelículas.

Los resultados positivos obtenidos en los cultivos de camarón con biopelículas fue probablemente una suma de los efectos directos de los microorganismos asociados a ellas, lo cual incluye la presencia de bacterias nitrificadoras que mejoraron la calidad del agua, a la excreción de menor cantidad de amonio por parte de los camarones al alimentarse de organismos vivos de las biopelículas en sustitución de una parte del alimento comercial, a la colonización del tracto digestivo de un mayor número de especies de microorganismos benéficos que se sabe que directa o indirectamente inducen la expresión y actividad de enzimas digestivas que mejoran la asimilación del alimento, así como de otros genes que aumentan la resistencia de los animales cultivados a diversos estreses bióticos y abióticos (Porchas-Cornejo *et al.* 2012; Zokaeifar *et al.* 2012; Anand *et al.* 2017; Duan *et al.* 2017).

Conclusiones

De la revisión realizada y de las experiencias de nuestro grupo de trabajo podemos concluir que:

1. La caracterización de los consorcios microbianos se ha facilitado grandemente con las nuevas herramientas metagenómicas y softwares que permiten no solamente la identificación de microorganismos a niveles muy específicos, sino además elucidar sus perfiles funcionales.
2. Es factible la manipulación de los consorcios mediante cambios inducidos en términos de: inóculos iniciales, suplementación de nutrientes específicos y manejo de sus proporciones, variación de las condiciones ambientales y fisicoquímicas de la columna de agua, introducción de sustratos fijos o flotantes de diferente origen, entre otros.
3. Independientemente del origen de los microorganismos formadores de biopelículas, su uso mejora la calidad del agua, así como las condiciones fisiológicas y del sistema inmune de camarones y peces, la cual puede medirse inicialmente por los cambios en la expresión de los genes de rutas metabólicas claves.
4. Los efectos anteriormente mencionados se reflejan en una mejor respuesta productiva de los organismos cultivados en términos de crecimiento, sobrevivencia, FCA, biomasa final obtenida y calidad postcosecha.

Referencias

- Anand S, Sudhayam P, Kumar S, Kohli M, Sundaray J. 2017. Dietary biofloc supplementation in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*: effects on immunity, antioxidant and metabolic enzyme activities. *Aquaculture Research*. 48:4512-4523.
- Cardona, E., Saulnier, D., Lorgeoux, B., Chim, L., & Gueguen, Y. (2015). Rearing effect of biofloc on antioxidant and antimicrobial transcriptional response in *Litopenaeus stylirostris* shrimp facing an experimental sub-lethal hydrogen peroxide stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 45: 933-939.
- Duan Y, Zhang Y, Dong H, Wang Y, Zheng X. 2017. Effect of dietary *Clostridium butyricum* on growth, intestine health status and resistance to ammonia stress in Pacific white shrimp *L.vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*. 65:25-33
- Ekasari J, Azhar M, Surawidjaja EH, Nuryati S, De Schryver P, Bossier P. 2014. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. *Fish & Shellfish Immunology*. 41: 332-339
- Garibay-Valdez, E., Martínez-Córdova, L. R., Vargas-Albores, F., Gollas-Galván, T., Lago-Leston, A., Calderón, K., & Martínez-Porchas, M. (2019). Biofilm consumption shapes the intestinal microbiota of shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition*, 25(2), 427-435.
- Guemez-Sorhouet, E., Villarreal, H., Racotta, I. S., Naranjo, J., & Mercier, L. (2019). Zootechnical and physiological responses of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae reared in bioflocs and subjected to stress conditions during nursery phase. *Aquaculture research*, 50(4), 1198-1211.
- Kheti, B., Kamilya, D., Choudhury, J., Parhi, J., Debbarma, M., & Singh, S. T. (2017). Dietary microbial floc potentiates immune response, immune relevant gene expression and disease resistance in rohu, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) fingerlings. *Aquaculture*, 468, 501-507.
- Kim K, Pang Z, Seo C, Cho R, Samocha T. 2014. Effect of bioflocs on growth and immune activity of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Research*. 45:362-371.
- Kim S, Min E, Kim H, Koo K, Kang J. 2015. Growth performance and immunological and antioxidant status of Chinese shrimp *Fennerpenaeus chinensis* reared in biofloc system using probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*. 47:41-146.
- Martins, G. B., da Rosa, C. E., Tarouco, F. D. M., & Robaldo, R. B. (2019). Growth, water quality and oxidative stress of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) in biofloc technology system at different pH. *Aquaculture research*, 50(4), 1030-1039.
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Hermosillo, O. A., & Ramírez Saad, H. C. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *ISRN microbiology*, 2012.
- Nguyen, T. D. P., Le, T. V. A., Show, P. L., Nguyen, T. T., Tran, M. H., Tran, T. N. T., & Lee, S. Y. (2019). Bioflocculation formation of microalgae-bacteria in enhancing microalgae harvesting and nutrient removal from wastewater effluent. *Bioresource Technology*, 272, 34-39.

- Ortiz-Estrada, A., Martínez-Porchas, M., & Vargas-Albores, F. (2017) La secuencia completa del gen ARN ribosomal 16S, una promesa para mejorar la precisión en la asignación taxonómica microbiana. En: Microbiología ambiental en México. Diagnóstico, tendencias en investigación y áreas de oportunidad. Eds: Arena Ortiz, M.L. & Chiappa Carrara F.X. Universidad Nacional Autónoma de México. Pages 50-62.
- Porchas-Cornejo A, Martínez-Porchas M, Martínez-Córdova L, Ramos-Trujillo L 2012. Consumption of natural and artificial foods by shrimp, *Litopenaeus vannamei* reared in ponds with and without enhancement of natural productivity. Isr. J. Aquacult.-Bamidgeh. IJA-64.2012, 709(7).
- Wang, S., Cui, X., Xu, R., Gao, M., & Sui, L. (2019). Effect of carbon and nitrogen ratio control on *Artemia* growth, water quality, biofloc microbial diversity under high salinity and zero-water exchange culture condition. Journal of Oceanology and Limnology, 37(5), 1768-1776.
- Xu, W. J., & Pan, L. Q. (2013). Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. Aquaculture, 412, 117-124.
- Zaneveld, G.I., Caporaso J., McDonald J., Knights D, Reyes, J., Clemente, J.C.; Burkepille, D.E.; Vega Thurber, R.L., Knight, R., Beiko, R.G. & Huttenhower, C. Crab R, Defoirdt T, Bossier P, Verstraete W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. Aquaculture. 356: 351-356.
- Zokaeifar H, Balcázar L, Saad R, Kamarudin S, Sijam K. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish & shellfish immunology. 33: 683-689.
- Nature Biotechnology, 1-10. 8 2013.

Microbiota Intestinal y la Salud en los Peces: Caso de estudio en la Nutrición de *Seriola lalandi* y *Totoaba macdonaldi* en Diferentes Condiciones Térmicas

Ernesto Larios Soriano¹, Ana Denise Re Araujo², Dariel Tovar Ramírez³, Bruno Gómez-Gil⁴, Lus M. López¹, Mario A. Galaviz¹.

¹ Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Facultad de Ciencias Marinas, Unidad Sauzal, Ensenada, Baja California, México.

² Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) Baja California, México.

³ Centro de Investigaciones del Noreste (CIBNOR), La Paz Baja California México.

⁴ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad-Mazatlán, Sinaloa, México, e-mail: elariosoriano@hotmail.com

Resumen

Este estudio analizó la correlación recíproca entre la temperatura y la dieta en la estructura de la microbiota intestinal de *Seriola lalandi*. Los juveniles se aclimataron a 20 y 26°C durante 30 días, durante este tiempo, los peces fueron alimentados con dietas con tres niveles de inclusión de lípidos (7, 14 y 21%). La microbiota fecal de *S. lalandi* se caracterizó utilizando la secuenciación de alto rendimiento de la región V3 del gen 16S rRNA. Se observó un cambio significativo en la microbiota fecal en relación con temperatura de aclimatación en donde en la temperatura de 26°C las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) identificadas pertenecían a las familias Pseudomonadaceae, Alcaligenaceae y Microbacteriaceae mientras que las en 20°C fueron Micavibrio, Comamonadaceae y Saprospiraceae. Además, se observaron diferencias significativas entre las OTUs identificados en los tratamientos dietéticos, en los que Actinobacterias (7% de lípidos), Gammaproteobacterias (14% de lípidos) y Betaproteobacterias (21% de lípidos) fueron los phylum identificados preferentemente a partir de cada dieta. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron la importancia de la temperatura ambiental y los componentes de las dietas para mantener un equilibrio en la microbiota intestinal de *Seriola lalandi*. Actualmente estamos desarrollando un proyecto con *Totoaba macdonaldi* donde analizaremos el efecto de la temperatura de aclimatación y la inclusión de soya en su dieta sobre la estructura y posible función de la comunidad microbiana.

Palabras clave: Microbiota intestinal, *Seriola lalandi*, *Totoaba macdonaldi*, Temperatura de aclimatación

Introducción

La microbiota intestinal puede ser definida como el conjunto de microorganismos que habitan el intestino de cualquier vertebrado (Sommer and Backhed, 2013). Dentro de estos microorganismos se pueden distinguir levaduras, hongos, protozoarios y virus, sin embargo, las bacterias son los microorganismos a los que se refiere el término microbiota intestinal debido a su abundancia y diversas funciones (Nayak, 2010; Serra *et al.*, 2019). Aunque la microbiota intestinal asociada a los vertebrados es muy diversa, se pueden reconocer a los phylum Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes como los principales grupos bacterianos asociados al intestino (Ikeda-Ohtsubo *et al.*, 2018).

El metabolismo de los diferentes microorganismos que habitan el intestino de los vertebrados puede favorecer la nutrición de los hospederos al mejorar la absorción de los nutrientes. Estos microorganismos pueden solubilizar los elementos de las dietas a través de enzimas extracelulares lo que facilita la absorción de las moléculas simples a través del epitelio intestinal del hospedero (Nayak, 2010; Ikeda-Ohtsubo *et al.*, 2018; Butt and Volkoff, 2019). Así mismo, pueden proveer de enzimas que el hospedero no presenta, y a través de estas, digerir compuestos de las dietas que los hospederos no pueden aprovechar (Butt and Volkoff, 2019). De esta manera, la microbiota intestinal puede llegar a ser un componente del sistema digestivo de suma importancia para la nutrición de los hospederos y un mecanismo a través del cual, es posible mejorar la asimilación de elementos alternativos en las dietas formuladas. Aparentemente el rol que la microbiota intestinal desempeña dentro del intestino de los hospederos es significativo para el desempeño fisiológico intestinal óptimo de los peces y así, generar el máximo aprovechamiento posible de los nutrientes de la dieta. Las dietas para el cultivo de peces carnívoros deben de presentar una calidad y cantidad adecuados de las porciones proteicas y lipídicas ya que las proteínas son una fuente de aminoácidos para la formación de tejido nuevo, mientras que los lípidos son utilizados para la generación de reservas energéticas y mantenimiento de los requerimientos energéticos diarios (Cowey and Sargent, 1972; Watanabe, 1987). En este caso, se conoce que algunos géneros bacterianos que comúnmente forman parte de la microbiota intestinal de peces carnívoros como lo son los *Vibrio* y las *Photobacterias*, producen proteasas que podrían contribuir a la solubilización

de las proteínas de la dieta (Ikeda-Ohtsubo *et al.*, 2018). Por otro lado, en estudios en el pez cebra, se han identificado diversos microorganismos que podrían estar asociados a la solubilización de lípidos y a la estimulación de la formación de gotas lipídicas en el epitelio intestinal (Semova *et al.*, 2012). Esta información es relevante ya que estipula la participación de la microbiota intestinal en el mantenimiento de la homeostasis energética y la regulación del metabolismo de lípidos en peces.

La microbiota intestinal, al igual que todos los demás sistemas que conforman un organismo vivo, sufre cambios al transcurrir el ciclo de vida del hospedero. Los primeros microorganismos que tienen la capacidad de colonizar el tracto digestivo de los peces, muchas veces están asociados a los huevecillos, y por supuesto, al medio ambiente que rodea a las larvas antes y después de eclosionar (Ringo, 1999; Austin, 2006). Cuando las larvas son capaces de alimentarse por sí mismas, es bien conocido que la estructura de la comunidad microbiana es modificada por los elementos de la dieta. Existen diferentes investigaciones donde se ha identificado la influencia de los elementos de las dietas en la estructura y abundancia de la comunidad microbiana de diferentes peces, siendo este, uno de los factores más estudiados por la relevancia para la nutrición acuícola (Kotzamanis *et al.*, 2007; Ingerslev *et al.*, 2014; Estruch *et al.*, 2015; Grajardo *et al.*, 2016; Neuman *et al.*, 2016; Villasante *et al.*, 2019). Por otro lado, los factores abióticos como la temperatura y la salinidad también pueden tener un impacto significativo en la microbiota intestinal, sin embargo, la influencia de estas variables aun no es del todo comprendida. La influencia de las variables físicas del medio donde se desarrollen los peces, deberá ser estudiada en relación a la nutrición de éstos debido a que repercuten significativamente en su desempeño fisiológico.

La temperatura es uno de los factores abióticos más importantes para el desempeño fisiológico de los organismos eco-termos como lo son los peces. En este caso, la temperatura gobierna la tasa en la que se llevan a cabo los diferentes procesos metabólicos (Schulte, 2015) y repercute en la velocidad en la que se lleva a cabo la alimentación, la asimilación de los nutrientes y, por lo tanto, el crecimiento (Secor, 2008; Miegel *et al.*, 2010; Bowyer *et al.*, 2012; Bowyer *et al.*, 2013). Al ser la temperatura un factor determinante de los procesos fisiológicos de los peces, esta variable física del agua, podría modificar la microbiota

intestinal de manera directa o indirecta y afectar la homeostasis y funcionamiento intestinal. Es por ello que en el presente trabajo de investigación se estudió el efecto de la temperatura de aclimatación y la dieta (dieta)? , sobre el metabolismo, el crecimiento y la microbiota intestinal del jurel *Seriola lalandi*, con ello aportar información que podría ser relevante para la nutrición de especies carnívoras y su relación con la microbiota intestinal.

Materiales y Métodos

Los experimentos fueron desarrollados en las instalaciones del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada Baja California (CICESE), México, en colaboración con el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Mazatlán, México. Para ello, 400 juveniles (6 ± 0.5 g) de la especie *S. lalandi* se obtuvieron de los laboratorios Baja Seas Aquaculture, Eréndira, Baja California, México. Los peces se transportaron por vía terrestre dentro de un estanque de 500 L hasta los laboratorios de Biotecnología Marina del CICESE.

Una vez en CICESE, los peces fueron distribuidos en seis estanques de fibra de vidrio de 500 L cada uno para su aclimatación a 20, 23, 26, 29 y 32°C. Los estanques fueron conectados a un sistema de recirculación de agua marina el cual está formado por un tanque de compensación de 100 m³, un sistema de filtración (filtro biológico y luz UV) y una bomba de 10-hp que distribuye el agua a los diferentes estanques. Así mismo, cada estanque contó con piedras de aireación para el suministro de oxígeno a través de un Blower de 10-hp (Regenair® Regenerative Blower, MI, USA), además, cada estanque contó con un sistema de control de temperaturas el cual consiste en una resistencia de 1000 watts (Finnex, TH-800 POLUS, Chicago, IL, USA) y un controlador térmico digital (Finnex, HC-0810M, Chicago, IL, US). Los peces fueron aclimatados durante 21 días a las diferentes temperaturas. Una vez concluido el periodo de aclimatación se realizaron las mediciones de consumo de oxígeno para determinar el efecto de la temperatura de aclimatación en el metabolismo de los juveniles.

El consumo de oxígeno se realizó en cámaras respirométricas de 1000 ml de capacidad colocadas dentro de un estanque de fibra de vidrio de 250 L. El estanque estuvo equipado

con el sistema de control térmico antes referido con el objetivo de mantener las condiciones térmicas del agua según se requiriera durante las mediciones de consumo de oxígeno. Las cámaras respirométricas fueron provistas de un sensor de fibra óptica (precisión $\pm 0.005\%$ O₂, límite de detección 0.03% O₂) conectado a un mini amplificador OXY-10 (PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, DE) para registrar el oxígeno disuelto en el agua. Cinco peces provenientes de una de las temperaturas de aclimatación, fueron introducidos individualmente en las cámaras de respirométricas, después de un periodo de 20 min con el sistema abierto, se procedió a cerrar las cámaras respirométricas y a realizar un registro de los valores de oxígeno disuelto dentro de las cámaras cada 30 s por 5 min. Posteriormente se extrajo a los peces de las cámaras para ser pesados y finalmente ser regresados a sus correspondientes estanques de aclimatación.

En la segunda etapa del proyecto, 150 juveniles (15 ± 2 g) fueron distribuidos en seis estanques de fibra de vidrio de 500 L cada uno, para evaluar el efecto de la temperatura de aclimatación en la microbiota intestinal de los juveniles. Los peces fueron aclimatados a las temperaturas de 20 y 26°C por 30 días. Durante este periodo de aclimatación, los organismos fueron alimentados con tres dietas diferentes (7, 14 y 21% de inclusión de lípidos; **Tabla 1**).

Table 1. Formulación de las dietas experimentales y composición proximal.

Ingredientes (g)	7% dieta	14% dieta	21% dieta
Harina de sardina	32,55	36,00	38,58
CPSP	13,00	25,00	30,00
Pasta de soja	10,00	10,00	10,00
Gluten de maíz	24,64	9,02	2,00
Harina integral de trigo	15,18	9,21	3,27
aceite de hígado de bacalao	0,20	2,83	5,22
Lecitina de soja	0,50	4,00	7,00
Ácido algínico	2,00	2,00	2,00
Premezcla mineral	1,00	1,00	1,00
Premezcla vitaminas	0,70	0,70	0,70
Cloruro de colina	0,13	0,13	0,13

Larios Soriano, E., Re Araujo, A.D., Tovar Ramírez, D., Gómez-Gil, B., López, L., Galaviz, M. 2019. Microbiota Intestinal y la Salud en los Peces: Caso de estudio en la Nutrición de *Seriola lalandi* y *Totoaba macdonaldi* en Diferentes Condiciones Térmicas. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 410-427.

Vitamina C Stay C	0,08	0,08	0,08
BHT antioxidante	0,02	0,02	0,02
Formulación total (g)	100,00	100,00	100,00
Humedad (%)	8.40	11.80	8.50
Proteína (%)	59.00	61.20	61.90
Extracto etéreo (%)	6.20	13.10	20.30
Fibra (%)	0.50	0.40	0.30
Ceniza (%)	9.20	10.40	11.00
Extracto libre de nitrógeno (%)	26.10	16.90	9.90
Energía (Cal / G)	4756.30	4978.90	5179.10

CPSP- Concentrado de proteína soluble de pescado.

Una vez que terminó el periodo de aclimatación, se colectaron muestras de heces de cuatro peces por tratamiento a través de stripping abdominal y se procedió a realizar la extracción de ADN genómico. El ADN total de las heces se extrajo con CTAB (Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE), utilizando 10 µl de lisozima, 20 µl de proteinasa K y tres choques térmicos de 50 / -80°C para la lisis celular. Después de la precipitación con etanol, la integridad del ADN se verificó a través de geles de agarosa al 1%. Se utilizó un espectrofotómetro UV NanoDrop ND-1000 para realizar las cuantificaciones de la biomasa del ADN (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.) posteriormente se amplificó la región V3 del gen 16S rRNA para su secuenciación. Esta región se amplificó por PCR con los cebadores propuestos por Huse *et al.* (2008); con adaptadores Illumina (San Diego, CA, EE. UU): 16S-V3_338f (TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG acy cct acg ggr ggc agc ag) y 16SV3_533r (GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G tta ccg cgg ctg ctg gca c). El programa de amplificación consistió en un paso de desnaturalización a 95°C El programa de amplificación consistió en un paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 35 s, alineamiento a 56°C durante 35 s y extensión 72°C durante 30 min; y extensión final a 72°C durante 10 min. Los amplicones de PCR se purificaron con perlas magnéticas Ampure XP y luego se agregaron índices Illumina para cada muestra en una

Larios Soriano, E., Re Araujo, A.D., Tovar Ramírez, D., Gómez-Gil, B., López, L., Galaviz, M. 2019. Microbiota Intestinal y la Salud en los Peces: Caso de estudio en la Nutrición de *Seriola lalandi* y *Totoaba macdonaldi* en Diferentes Condiciones Térmicas. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 410-427.

segunda PCR, seguido de una segunda limpieza con perlas magnéticas. Este grupo se cuantificó con el ensayo HS para el Qubit y se ajustó a 4 nM para una mayor desnaturalización, dilución a 2 pM y secuenciación en una celda de flujo de salida media (300 ciclos) en un Illumina Miniseq. Una vez que los archivos de secuenciación se obtuvieron en formato FASTQ, se procesaron con el pipeline metagenómica https://github.com/GenomicaMicrob/metagenomic_pipeline.

Resultados

El efecto de la temperatura de aclimatación sobre la tasa metabólica de los juveniles fue significativo ($p < 0.05$); cuanto mayor fue la temperatura de aclimatación, se observó un incremento del consumo de oxígeno hasta la temperatura de 29°C (**Figura 1**). Aunque no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los consumos de oxígeno en los organismos aclimatados a las temperaturas de 20 hasta 26°C, se registró una tendencia a incrementar con respecto al aumento de la temperatura de aclimatación. En la temperatura de aclimatación de 29°C se presentaron los valores mayores de consumo de oxígeno, mientras que en 32°C se registró una disminución de la tasa de consumo de oxígeno con respecto a la temperatura de 29°C.

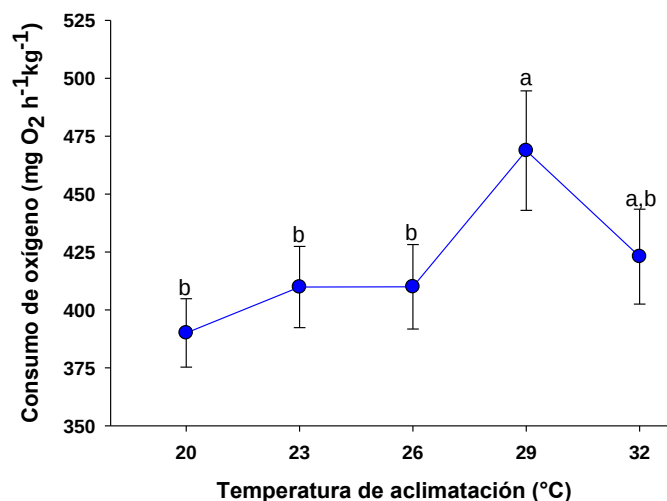


Figura 1. Consumo de oxígeno de los juveniles de *Seriola lalandi* aclimatados a las temperaturas de 20, 23, 26, 29 y

32°C. Los valores de consumo de oxígeno son representados como los promedios $\pm$ ES y las diferencias estadísticas significativas (p) son representadas con diferentes letras.

El crecimiento de los peces fue significativamente diferente ($p < 0.05$) respecto a las temperaturas y las dietas suministradas (**Tabla 2**). Los peces con mayor tasa de crecimiento fueron los alimentados con las dietas de 14 y 21% de lípidos lo que generó también mayor incorporación de lípidos en hígado (datos no mostrados). En los peces alimentados con una dieta del 7%, los valores de PI, PG% y TCE fueron más bajos en ambas temperaturas de aclimatación. Además, los organismos alimentados con la dieta del 7% no generaron reservas de energía en el hígado ya que no se observaron depósitos de lípidos en las secciones histológicas (datos no mostrados). Eso indica que la dieta de inclusión de lípidos al 7% no fue suficiente para mantener el crecimiento de organismos juveniles.

Tabla 2. Parámetros de rendimiento de crecimiento inicial y final y utilización de alimento de *S. lalandi* alimentado con dietas

T	20°C			26°C		
DIETAS	7%	14%	21%	7%	14%	21%
PI	53.5 ± 4.2	52.5 ± 3.4	53.2 ± 4.5	52.5 ± 2.8	52.7 ± 5.1	53.5 ± 6.4
PF	61.3 ± 10.1 ^a	80.9 ± 12.5 ^b	71.3 ± 13.6 ^c	64.8 ± 9.1 ^a	81.8 ± 10.9 ^b	90.0 ± 6.6 ^d
PG %	14.6 ^a	54.3 ^b	34.0 ^c	23.4 ^a	55.2 ^b	68.2 ^d
TCS	0.4 ^a	1.4 ^b	0.9 ^c	0.7 ^b	1.5 ^d	1.7 ^e
FC	0.9 ^a	0.8 ^{ab}	0.9 ^a	0.9 ^a	1.1 ^{ac}	0.9 ^a
TCA	3.2 ^a	1.6 ^b	2.5 ^a	3.7 ^a	1.5 ^b	1.2 ^b

PI- Peso inicial (media ± DE), PF – Peso final (media ± DE), PG% - Porcentaje de ganancia de peso, TCS - Tasa de crecimiento específica, FC – Factor de conversión, TCA- Tasa de conversión alimenticia.

experimentales a las dos temperaturas de aclimatación

Tras la secuenciación masiva de la región V3 del gen 16S ARNr se obtuvieron 833,912 secuencias, de las cuales se asignaron a 2405 OTUs. Los grupos bacterianos que se encontraron independientemente del tratamiento fueron Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes. En los tratamientos a 26°C las principales familias fueron Alcaligenaceae, Microbactetiaceae y Pseudomonadaceae, mientras que para los organismos aclimatados a 20°C fueron Comamonadaceae, Micavibrio y Saprospiraceae (**Figura 2**).

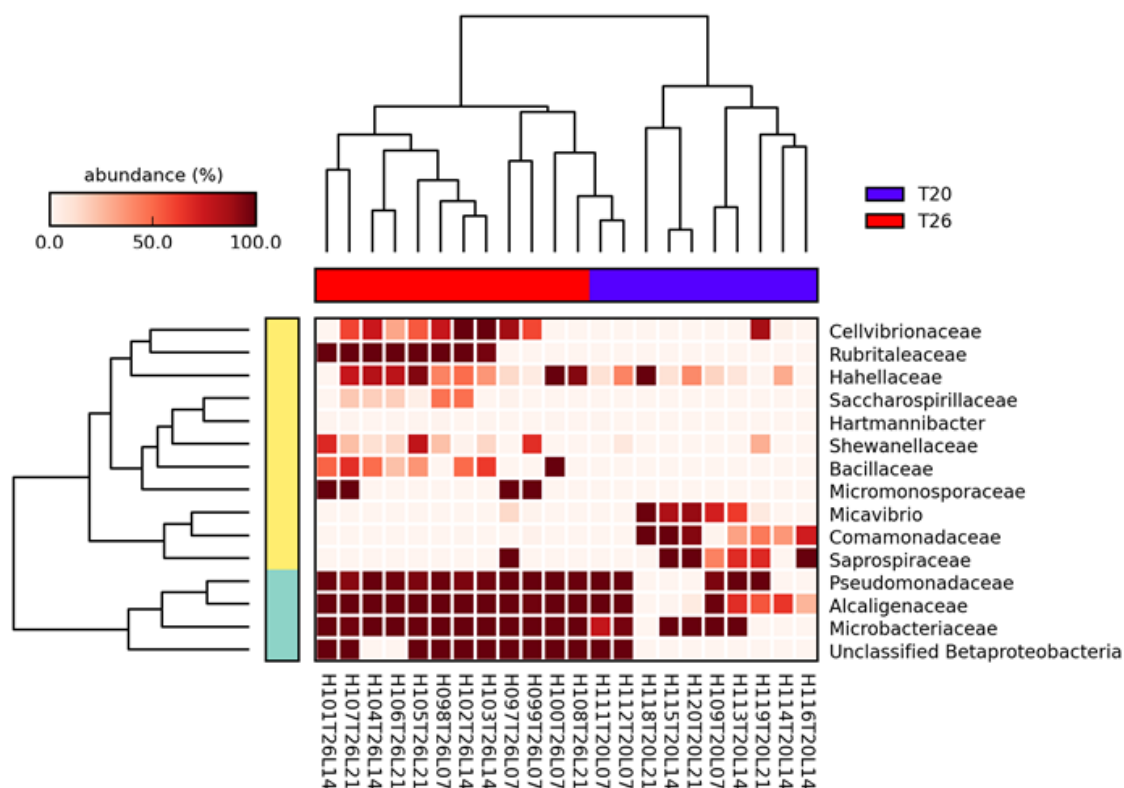


Figura 2 Microbiota intestinal del jurel *Seriola lalandi* aclimatados a 20 y 23°C. Los peces se alimentaron con diferentes proporciones de lípidos donde L07 fue el tratamiento con un porcentaje de inclusión del 7% de lípidos, L14 fue de 14% de inclusión de lípidos y L21 fue la dieta con 21% de inclusión de lípidos.

Los OTUs identificados en 20°C correspondieron a las familias Enterobacteriaceae, Bradyrhizobiaceae y Propionibacterium, los cuales pertenecen a los phylum Proteobacteria, Actinobacteria respectivamente (**Figura 3**).

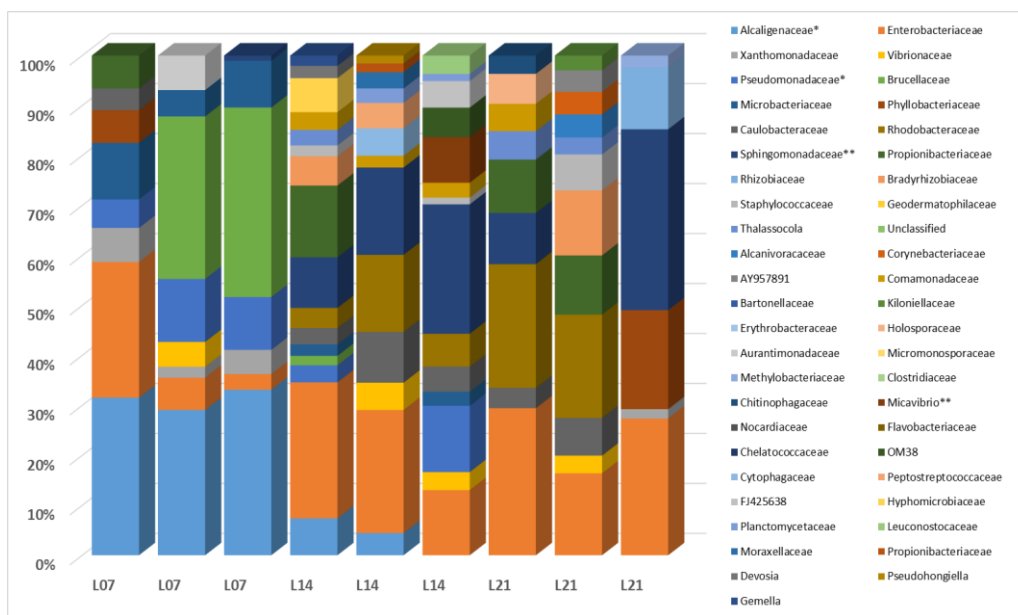


Figura 3. Abundancia relativa de la microbiota intestinal asociada a las heces de *Seriola lalandi* acimatados a 20°C. Los peces se alimentaron con diferentes proporciones de lípidos donde L07 fue el tratamiento con un porcentaje de inclusión del 7% de lípidos, L14 fue de 14% de inclusión de lípidos y L21 fue la dieta con 21% de inclusión de lípidos.

Los organismos aclimatados a 26°C presentaron menores valores en los índices de riquezas (Chao-1 = 1525, Shannon = 3.86) que los organismos aclimatados a 20°C (Chao-1 = 1603, Shannon = 4.75) independientemente de la dieta que consumieron, sin embargo, mayor número de individuos (Individuos 941,106 en 26°C vs 360,543 en 20°C). En relación al efecto de las dietas, en los organismos aclimatados a 26°C fue mayor la riqueza de especies en los organismos alimentados con las dietas con menor porcentaje de inclusión de lípidos (Chao-1 = 965, 646, 551; Shannon = 4.15, 3.35, 3.33 respectivamente). Por otro lado, en 20°C con el incremento del porcentaje de inclusión de lípidos, se encontró mayores índices de riqueza (Chao-1 = 500, 431, 1117; Shannon = 3.06, 4.28, 4.41 respectivamente). Cabe destacar que la dieta de 21% de inclusión de lípidos en los peces a 20°C presentó el mayor número de individuos en comparación a los demás tratamientos (Individuos = 254,430).

Discusión

En la presente investigación se evaluó primero el efecto de la temperatura de aclimatación en el consumo de oxígeno de *Seriola lalandi* como un indicador del estado metabólico de los juveniles, con ello identificamos las temperaturas óptimas y sub-óptimas para el desempeño metabólico de esta especie. Posteriormente, se evaluó el efecto de dos temperaturas (temperatura óptimas y temperatura sub-óptima) así como el porcentaje de inclusión de lípidos en sus dietas en su crecimiento y en la estructura de su microbiota intestinal. Estos resultados son discutidos en relación a la salud nutricional de esta especie en diferentes condiciones térmicas.

Las tasas de consumo de oxígeno fueron influenciadas por las temperaturas de aclimatación donde observamos un incremento del consumo de oxígeno con respecto al aumento de la temperatura desde 20 hasta 29°C, para finalmente disminuir a 32°C. Este efecto de la temperatura de aclimatación sobre la tasa metabólica ya ha sido previamente caracterizado (Brett, Groves, 1979; Dowd, 2006). Los estudios han sugerido que existe una relación intrínseca entre la tasa metabólica de rutina de los peces y la temperatura ambiental, por lo que la tasa metabólica normalmente aumenta de la misma manera que la temperatura. Este fenómeno se ha explicado con la curva de rendimiento térmico (según la ecuación de Arrhenius) como un efecto termodinámico (Schulte, 2015). En este caso, los organismos aclimatados a temperaturas de 29°C probablemente requirieron un aumento significativo en las tasas de consumo de oxígeno para compensar la insuficiencia del suministro de oxígeno celular, mientras que los organismos aclimatados a 32°C mostraron un estado de agotamiento en esta temperatura durante el período de aclimatación de 21 días. Probablemente la supervivencia de los juveniles en 32°C dependerá de la capacidad bioquímica para la producción de ATP dependiente de oxígeno y la capacidad de reducir la demanda de energía mediante la supresión controlada de la tasa metabólica (Rosewarne *et al.*, 2016).

Cuando analizamos el efecto de la temperatura de aclimatación y el porcentaje de lípidos incluidos en la dieta, observamos menor peso final y crecimiento específico en los organismos alimentados con las dietas de 7% de inclusión de lípidos independientemente de la temperatura de aclimatación. La disminución en el crecimiento con respecto a una

disminución en la proporción de lípidos en la dieta se ha observado en otras especies de peces marinos como *Sparus aurata* (Caballero *et al.*, 1999). Esta disminución en el crecimiento está relacionada con la insuficiencia de los niveles de lípidos para mantener la energía necesaria y con esto un uso posterior de proteínas en la dieta para generar energía (Cowey y Sargent, 1977; Douglas, 2003). Esto sugiere en el uso de lípidos en la dieta para mantener la energía, lo que impide la generación de reservas de energía en tejidos como el hígado.

Se ha informado que el aumento del porcentaje de lípidos puede contribuir a mantener la deposición de proteínas (Kaushik y Cowey, 1991; Kaushik y Médale, 1994; Van der Meer *et al.*, 1997). De esta manera, nuestros tratamientos con 21% de inclusión de lípidos no parecen dañar a los peces de ninguna manera. Este porcentaje de lípidos generó altos valores de crecimiento, y también se observó la generación de reservas de energía en el hígado. Cabe señalar que diferentes estudios han informado que esta formación de gotas de lípidos está asociada con un estado saludable y no con un síndrome patológico (Mosconi-Bac 1987; Segner y Witt 1990).

Los grupos bacterianos identificados a través de la secuenciación masiva de la región V3 del gen 16SARNr han sido reportados anteriormente como parte de la microbiota intestinal de peces marinos (Ikeda-Ohtsubo *et al.*, 2018). En este caso, al realizar los análisis de los efectos combinados de la temperatura y la proporción de lípidos dietarios, es posible señalar que el factor que propicio el mantenimiento de la microbiota intestinal en los diferentes tratamientos alimenticios a 26°C fue la temperatura ambiental; la disminución de la temperatura del agua de 26 a 20°C disminuyó el número de OTUs de los grupos bacterianos más abundantes. Según nuestros resultados, la temperatura de 26°C podría considerarse la temperatura óptima no sólo para el metabolismo de *S. lalandi* sino también para mantener la estabilidad en la microbiota intestinal a pesar del hecho de que se suministraron dietas con diferentes proporciones de lípidos.

Los grupos bacterianos que fueron diferencialmente identificados en los tratamientos con mayor inclusión de lípidos fueron los géneros *Citrobacter* y *Enterobacter*, estos dos grupos son ampliamente conocidos por su contribución enzimática durante los procesos de digestión en diferentes peces (Ray *et al.*, 2012). Se sabe que la microbiota intestinal desempeña un papel determinante en el estado de salud del huésped; en general, una comunidad bacteriana

beneficiosa muestra altos valores de riqueza y abundancia relativa, que se asocia con una mayor capacidad metabólica y bienestar (Dehler *et al.*, 2017). De esta forma, es posible señalar que, en 20°C, la microbiota intestinal de *S. lalandi* requiere de la inclusión de mayor porcentaje de lípidos para mantener altos niveles de riqueza y abundancia saludables.

Conclusión

Factores ambientales, como la temperatura, tienen un efecto determinante en la composición de la microbiota intestinal de *Seriola lalandi*. La temperatura de aclimatación de 26°C permitió el establecimiento de la microbiota intestinal a pesar de que se suministraron diferentes dietas; en contraste, la temperatura de aclimatación de 20°C se asoció a un aumento en la riqueza de especies, pero una disminución en la abundancia relativa de la microbiota intestinal. No obstante, la inclusión de una cantidad de 21% de lípidos en la dieta permitió mantener los valores altos de índices de riqueza y abundancia de la microbiota intestinal a pesar de encontrarse en una temperatura sub-óptima.

Perspectivas a futuro: *Totoaba macdonaldi*

La *Totoaba macdonaldi* es un pez carnívoro marino endémico del Golfo de México que puede llegar a crecer hasta 2 m y pesar 100 kg (Flanagan and Hendrickson, 1976; Román-Rodríguez, 1994). Desde los años 90, este organismo ha sido de gran importancia para la economía de esta región lo que eventualmente ocasionó la reducción de sus poblaciones hasta casi su extinción (Cisneros-Mata *et al.*, 1995). Debido a ello, diferentes instituciones como la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) dedican tiempo y recursos para su estudio, recuperación de poblaciones naturales y aprovechamiento sustentable.

Uno de los principales desafíos para la acuicultura de peces carnívoros, es encontrar alternativas nutricionales que sustituyan total o parcialmente los elementos convencionales de las dietas (harinas de pescado). Por ejemplo, las fuentes proteicas vegetales, son una de las alternativas para la producción sustentable de alimentos para la acuicultura, siendo la

soya ampliamente estudiada por su alto contenido proteico (Hardy 2010; Daniel, 2016; Chakraborty *et al.*, 2019). Si bien la soya puede aportar de 44 hasta 65% de proteína cruda, la soya y los compuestos derivados de la misma, contienen diferentes compuestos anti nutricionales que afectan la integridad del intestino, la actividad enzimática y la absorción de nutrientes (Francis *et al.*, 2001).

La microbiota intestinal puede ayudar a metabolizar los compuestos anti nutricionales de la soya, así como contribuir a la digestión de las proteínas de origen vegetal y mejorar su absorción. La investigación en torno al efecto de los componentes de las dietas en la microbiota intestinal de las diferentes especies, puede contribuir a dilucidar la relación entre los microorganismos en el intestino de los peces y su salud intestinal. De esta forma, manipular la microbiota intestinal a través de la alimentación para obtener las mejores respuestas no solo en crecimiento, sino también en salud acuícola. Es por ello que en el presente estudio se plantea investigar el efecto del concentrado proteico de soya sobre el transcriptoma del hígado y la microbiota intestinal de la *Totoaba macdonaldi* para generar información relevante a líneas de investigación como la nutrición acuícola que contribuirán a la sumar de elementos para la toma de decisiones en el desarrollo de los proyectos de nutrición acuícola.

Como primer objetivo, se determinará la biología térmica de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, para ello se aclimatarán por 20 días 200 juveniles de un peso promedio de 50 g a las temperaturas de 20, 23, 26, 29°C. Posterior al periodo de aclimatación se evaluarán las tasas de consumo de oxígeno, el crecimiento, y el efecto de las cinco temperaturas de aclimatación sobre la microbiota intestinal de los juveniles. Posteriormente se evaluará la mejor condición térmica y se suplementaran cuatro dietas diferentes con los porcentajes de inclusión de soja de 0, 15, 30 y 45%. Al final de los bioensayos se evaluarán el crecimiento, actividad enzimática, histología del intestino y finalmente el efecto de la soya en la estructura de la comunidad microbiana.

Literatura citada

- Austin, B. (2006). The bacterial microflora of fish, revised. *The Scientific World Journal*, 6, 931-945.
- Bowyer, J. N., Qin, J. G., Smullen, R. P., & Stone, D. A. J. (2012). Replacement of fish oil by poultry oil and canola oil in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) at optimal and suboptimal temperatures. *Aquaculture*, 356, 211-222.
- Bowyer, J. N., Qin, J. G., Smullen, R. P., Adams, L. R., Thomson, M. J., & Stone, D. A. (2013). The use of a soy product in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) feeds at different water temperatures: 2. Soy protein concentrate. *Aquaculture*, 410, 1-10.
- Brett J.R. and Groves T.D.D., (1979). Physiological energetics. In: Fish Physiology. Vol VIII: Bioenergetics and Growth (ed.by W.S. Hoar, D.J. Randall & J.R. Brett), pp. 279-352. *Academic Press*, NewYork, USA.
- Caballero, M.J., López-Calero, G., Socorro, J., Roo, F.J., Izquierdo, M.S., Fernández, A.J. (1999). Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream *Sparus aurata*. *Aquaculture*. 179, 1999. 277–290.
- Chakraborty, P., Mallik, A., Sarang, N., & Lingam, S. S. (2019). A review on alternative plant protein sources available for future sustainable aqua feed production. *IJCS*, 7(3), 1399-1404.
- Cisneros-Mata, M. A., Montemayor-López, G., & Román-Rodríguez, M. J. (1995). Life history and conservation of Totoaba macdonaldi. *Conservation Biology*, 9(4), 806-814.
- Cowey, C. B., & Sargent, J. R. (1972). Fish nutrition. In *Advances in marine biology* (Vol. 10, pp. 383-494). *Academic Press*.
- Cowey, C. B. and Sargent, J. R. (1977). Minireview Lipid Nutrition in Fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 1977, Vol. 57B, pp. 269 to 273.
- Daniel, N. (2017). Status of aquaculture with respect to nutrition and feed. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5(1), 333-345.
- Dehler, C.E., Secombes, C.J., Martin, S.A.M., (2017). Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 467, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.017>.
- Douglas, R. T. (2003). Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish, *Reviews in Fisheries Science*, 11:2, 107-184, DOI: 10.1080/713610925.
- Dowd, W. W., Brill, R. W., Bushnell, P. G., Musick, J. A., (2006). Standard and routine metabolic rates of juvenile sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*), including the effects of body mass and acute temperature change, *Fish. Bull.* (2720), 323–331.
- Estruch, G., Collado, M. C., Peñaranda, D. S., Vidal, A. T., Cerdá, M. J., Martínez, G. P., & Martínez-Llorens, S. (2015). Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on the

- gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16S rRNA gene. *PLoS One*, 10(8), e0136389.
- Flanagan, C. A., & Hendrickson, J. R. (1976). Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba, *Cynoscion macdonaldi*, in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin*, 74(3), 531-544.
- Francis, G., Makkar, H. P., & Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199(3-4), 197-227.
- Gajardo, K., Jaramillo-Torres, A., Kortner, T. M., Merrifield, D. L., Tinsley, J., Bakke, A. M., & Krogdahl, Å. (2017). Alternative protein sources in the diet modulate microbiota and functionality in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 83(5), e02615-16.
- Hardy, R. W. (2010). Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research*, 41(5), 770-776.
- Huse, S.M., Dethlefsen, L., Huber, J.A., Welch, D.M., Relman, D.A., Sogin, M.L., (2008). Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genet.* 4 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000255>.
- Ikeda-Ohtsubo, W., Brugman, S., Warden, C. H., Rebel, J. M., Folkerts, G., & Pieterse, C. M. (2018). How Can We Define “Optimal Microbiota?”: A Comparative Review of Structure and Functions of Microbiota of Animals, Fish, and Plants in Agriculture. *Frontiers in nutrition*, 5.
- Ingerslev, H. C., Strube, M. L., von Gersdorff Jørgensen, L., Dalsgaard, I., Boye, M., & Madsen, L. (2014). Diet type dictates the gut microbiota and the immune response against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & shellfish immunology*, 40(2), 624-633.
- Kaushik, S. J., Cowey, C. B. (1991). Dietary factors affecting nitrogen excretion by fish. In: Cowey, C.B., Cho, C.Y. _Eds. Nutritional Strategy and Aquaculture Waste. Proceedings of the First International Symposium on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 3–19 pp.
- Kaushik, S.J., Médale, F. (1994). Energy requirements, utilization and dietary supply to salmonids. *Aquaculture*, 124, 81–97.
- Kotzamanis, Y. P., Gisbert, E., Gatesoupe, F. J., Infante, J. Z., & Cahu, C. (2007). Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147(1), 205-214.
- Miegel, R. P., Pain, S. J., Van Wetters, W. H. E. J., Howarth, G. S., & Stone, D. A. J. (2010). Effect of water temperature on gut transit time, digestive enzyme activity and nutrient digestibility in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 308(3-4), 145-151.
- Mosconi-Bac, N. (1987). Hepatic disturbances induced by artificial feed in the sea bass *Dicentrarchus labrax* during the first year of life. *Aquaculture*, 153, 251–261.

- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41, 1553–1573.
- Neuman, C., Hatje, E., Zarkasi, K. Z., Smullen, R., Bowman, J. P., & Katouli, M. (2016). The effect of diet and environmental temperature on the faecal microbiota of farmed Tasmanian Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, 47(2), 660-672.
- Ringø, E., & Birkbeck, T. H. (1999). Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture research*, 30(2), 73-93.
- Rosewarne, P. J., Wilson, J. M., Svendsen, J. C. (2016). Measuring maximum and standard metabolic rates using intermittent-flow respirometry: A student laboratory investigation of aerobic metabolic scope and environmental hypoxia in aquatic breathers.
- Schulte, P. M. (2015). The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1856-1866.
- Secor, S. M. (2009). Specific dynamic action: a review of the postprandial metabolic response. *Journal of Comparative Physiology B*, 179(1), 1-56.
- Semova, I., Carten, J. D., Stombaugh, J., Mackey, L. C., Knight, R., Farber, S. A., & Rawls, J. F. (2012). Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell host & microbe*, 12(3), 277-288.
- Segner, H., Witt, U. (1990). Weaning experiments with turbot *Scophthalmus maximus*: electron microscopic study of the liver. *Mar. Biol.* 105, 353–361.
- Serra, C. R., Almeida, E. M., Guerreiro, I., Santos, R., Merrifield, D. L., Tavares, F., ... & Enes, P. (2019). Selection of carbohydrate-active probiotics from the gut of carnivorous fish fed plant-based diets. *Scientific reports*, 9(1), 6384.
- Sommer, F., & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 227.
- Van der Meer, M.B., Zamora, J.E., Verdegem, M.C.J. (1997). Effect of dietary lipid level on protein utilisation and the size and proximate composition of body compartments of *Colossoma macropomum* Cuvier. *Aquacult. Res.* 28, 405–417.
- Villasante, A., Ramírez, C., Catalán, N., Opazo, R., Dantagnan, P., & Romero, J. (2019). Effect of Dietary Carbohydrate-to-Protein Ratio on Gut Microbiota in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Animals*, 9(3), 89.
- Volkoff, H., & Butt, R. L. (2019). Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Frontiers in endocrinology*, 10, 9.
- Watanabe, T. (1982). Lipid nutrition in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 73(1), 3-15.

Presente y Futuro de los Probióticos en la Nutrición de Peces y la Modulación de su Microbiota

Luciana Raggi Hoyos¹, Mateo Amillano² Pamela Navarrete Ramírez¹, Ma. Gisela Ríos Durán², C. Cristian Martínez Chávez² y Ruth Pedroza Islas y Carlos A. Martínez-Palacios²

1. CONACYT-LANMDA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales-UMSNH.
2. LANMDA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales-UMSNH

E-mail: luciana.raggi@gmail.com

Resumen

Los peces de cultivo tendrán un papel protagónico como fuente de proteínas para la humanidad en el futuro inmediato. La sustentabilidad de la piscicultura podría potenciarse a través de una nutrición adecuada que vaya de la mano con la diversidad y la modulación de la microbiota intestinal de los peces. Dicha modulación, a través de la suplementación dietética de probióticos, es una nueva alternativa para mejorar la salud intestinal, potenciar el crecimiento y el bienestar de los peces de cultivo. Al estimular la microbiota, se mejora la utilización de nutrientes, el metabolismo y la respuesta inmune. En este trabajo se revisan los efectos de los probióticos en peces, con un enfoque nutrigenómico, así como su influencia en la microbiota y sus efectos en el hospedero. El futuro de la investigación y la utilización de probióticos, con el apoyo de ciencias ómicas (nutrigenómica y microbiómica), nos llevará a la búsqueda de probióticos autóctonos aislados de los propios hospederos, que tienen el potencial de ser más eficientes que los probióticos alóctonos. Con la generación de dietas con probióticos autóctonos se espera obtener mayor eficiencia en la nutrición y desempeño de los peces.

Palabras claves: Probióticos, acuicultura, microbiota

1- Introducción

Se estima que para el 2050 se alcanzarán los 9 billones de habitantes en el mundo, por lo que es necesario duplicar la producción actual de alimentos, a nivel global (Grafton *et al.*, 2015). La acuicultura deberá ser una opción atractiva para la expansión de la oferta de proteína animal, cuando llegue el momento en que los recursos sean altamente limitados y la selección oportuna de especies permitirá que un mayor número de personas tengan acceso a estos productos.

Dentro de la diversidad de organismos cultivados, los peces son el recurso más importante, puesto que unos 3,200 millones de personas en todo el mundo dependen del pescado, para al menos el 20% de su ingesta de proteína animal, consumiéndose aproximadamente 20 kg de pescado *per capita* al año (FAO, 2018). De la misma manera, los aceites extraídos de los peces son de suma importancia, puesto que pueden contener hasta el 60% de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), los cuales son ácidos grasos omega 3, muy importantes en la nutrición humana (FAO, 2010). Según el último registro (2016) publicado por la FAO en el año 2018, el continente con mayor producción en piscicultura fue Asia con 47.72 millones de toneladas. El segundo y tercer lugar en producción fueron América y África, con una producción de 1.98 y 1.97 millones de toneladas, respectivamente. Mientras que en Asia y África la producción va en aumento, en América se ha mantenido estable. México contribuyó con una cantidad de 377,000 toneladas en el año 2016 con un valor monetario de 13,765 millones de pesos (CONAPESCA, 2017). Al igual que en la mayoría de los países en el mundo, la producción acuícola en México está teniendo una tendencia hacia el crecimiento debido al crecimiento poblacional y al incremento de la demanda de alimentos nutraceuticos ricos en proteína animal y ácidos grasos omega 3.

La acuicultura se ha enfrentado en los últimos años a una variedad de retos debido a la alta demanda, como el cultivo a altas densidades (cultivos intensivos y super-intensivos) y el uso

indiscriminado de antibióticos con el fin de incrementar la producción. Estas prácticas, además de causar daños al medio ambiente debido a efectos físicos y ecológicos, como cambios en la calidad del agua o en estructuras de hábitats acuáticos, conducen a condiciones de alto estrés en los animales acuáticos y resistencia a los antibióticos, lo cual puede resultar en la propagación de enfermedades por infecciones bacterianas causando mortalidades masivas (Cabello, 2006; Ashley, 2007) y, por tanto, causando fuertes pérdidas económicas. Es importante mencionar que los costos de la alimentación en la acuicultura siguen representando hasta el 80% y que no se han realizado esfuerzos suficientes para reducir estos valores y aumentar la conversión alimenticia de las especies. Debido a lo anterior, se deben reconsiderar la calidad de los alimentos y los métodos de alimentación, para mejorar el rendimiento en el crecimiento y la eficiencia alimenticia de los animales cultivados. En las últimas dos décadas, la industria acuícola se ha dado a la tarea de innovar en alimentos funcionales incluyendo la adición de probióticos en alimentos siguiendo las tendencias previas en la medicina humana, en animales de compañía, así como en las industrias avícola, porcina y bovina aunque en muchas de estas de forma empírica.

El objetivo de esta revisión es analizar los múltiples efectos de los probióticos en el cultivo de diferentes especies de peces con importancia comercial alimenticia, así como conocer las características que deben cumplir para su uso, y demostrar su efectividad y viabilidad, sus dosis, tiempo de aplicación y efectos en la salud y crecimiento de los peces.

2- Definición de probiótico

La palabra probiótico se construye a partir de la palabra latina *pro* (para) y la palabra griega *bios* (vida) (Zivkovic, 1999). La FAO/WHO (2006) y Ganguly *et al.* (2011) han definido a los probióticos como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, proporcionan beneficios para la salud del huésped". En términos de acuicultura, una buena definición de probióticos es la proporcionada por Merrifield *et al.* (2010), quienes lo definen como "una célula viva, muerta o componente de una célula microbiana que, cuando se administra a través del alimento o en el agua, beneficia al organismo hospedero al

mejorar la resistencia a la enfermedad, el estado de salud, el rendimiento en el crecimiento, la utilización del alimento, la respuesta al estrés o vigor general, que se logra al menos en parte a través de la mejora del balance microbiano del huésped o el balance microbiano del medio ambiente” .

3- Probióticos en la industria alimentaria

La biotecnología alimentaria es la aplicación de técnicas modernas para la fabricación y el procesamiento de alimentos, por ejemplo a través de la fermentación y los aditivos (Lee, 2015). Dentro de ésta área se encuentra la obtención de alimentos funcionales, los cuales son alimentos naturales o procesados que contienen compuestos biológicamente activos y conocidos que, en cantidades adecuadas, proporcionan un beneficio demostrado para la salud (Lee, 2015). Cuando se usa la inclusión de probióticos para obtener alimentos funcionales, se requieren dosis adecuadas de probióticos que no deberán perderse antes de su consumo, para que tengan un efecto benéfico en el organismo receptor . Existen varios factores durante el procesamiento y el almacenamiento que afectan la viabilidad de los probióticos (Tripathi y Giri, 2014; Figura 1), los cuales deben tenerse en cuenta a la hora de incluirlos como aditivos alimenticios.

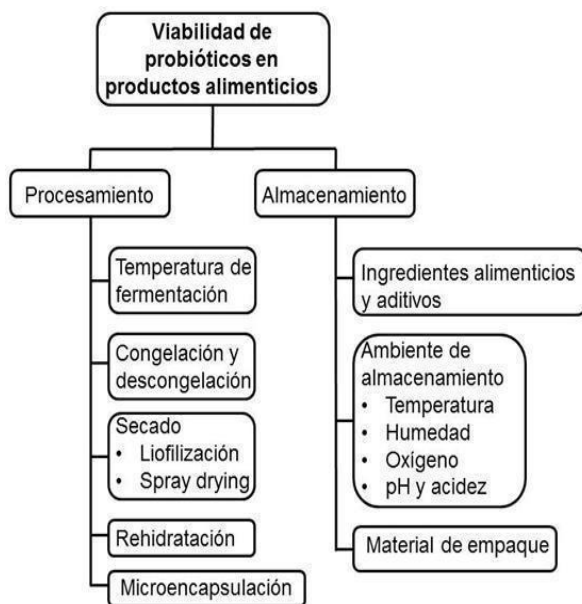


Figura 1. Factores importantes que afectan la viabilidad de los probióticos. (Tripathi y Giri, 2014)

4- Microencapsulación de probióticos

La microencapsulación es un proceso que consiste en cubrir células probióticas con una sustancia adecuada de tal forma que se produzca una liberación adecuada en el medio intestinal (Tripathi y Giri, 2014). Los materiales utilizados para encapsular los probióticos incluyen polisacáridos como alginato, goma vegetal, quitosano, almidón, K-carragenano, acetato-ftalato de celulosa, gelatina, proteínas de la leche y grasas (Ying, *et al.* 2010; Burgain, *et al.* 2011; Tripathi y Giri, 2014). La microencapsulación ha funcionado con éxito para evitar factores perjudiciales durante el procesamiento y almacenamiento tales como como un pH bajo, presencia de sales biliares, golpes de calor causados por secado por atomización, descargas frías inducidas por congelación, bacteriófagos y agentes antimicrobianos químicos (Lee y Heo, 2000; Sultana, *et al.* 2000; Ding y Shah, 2007). Además, la microencapsulación protege a las células del calor extremo del proceso y ayuda a la inmovilización de las células para su distribución homogénea a través del alimento (Krasaekoopt, *et al.* 2003; Tripathi y Giri, 2014).

5- Beneficios de los probióticos en humanos

Los beneficios de salud debidos a los probióticos, sólo se pueden obtener cuando el alimento contiene el recuento mínimo de microorganismos viables requerido en el momento del consumo. La FDA recomienda que el conteo mínimo de microorganismos probióticos en un alimento probiótico sea al menos de 10^6 UFC/mL (Boylston, *et al.* 2004; Tripathi y Giri, 2014) y la industria alimentaria ha adoptado esta cantidad como nivel mínimo recomendado. La mayoría de los efectos benéficos de los probióticos en humanos se asocian con la salud, el equilibrio de la microbiota intestinal, la prevención de la diarrea infecciosa, la mejora de la intolerancia a la lactosa, la mejora de la absorción de calcio, la síntesis de vitaminas, la pre-digestión de proteínas, grasas y carbohidratos, una mejor biodisponibilidad de nutrientes, actividad antimicrobiana contra infecciones gastrointestinales, alivio del estreñimiento, adherencia y resistencia a la colonización y mantenimiento de la integridad de la mucosa. Durante las últimas dos décadas se han encontrado otros beneficios como la reducción del colesterol sérico, la reducción de los mutágenos que pueden inducir tumores y el aumento de la respuesta del sistema inmunológico (Lee, 2015; Figura 2). Además, existen evidencias que apoyan posibles aplicaciones clínicas de los probióticos en la prevención y el tratamiento de enfermedades urogenitales y enfermedades respiratorias (Gardiner, *et al.* 2002; Tripathi y Giri, 2014; Figura 2).



Figura 2. Beneficios de probióticos en la salud humana (Tripathi y Giri, 2014).

6- Características que debe cumplir un probiótico para su uso en acuicultura

Para que un probiótico pueda ser utilizado en la acuicultura, debe cumplir con ciertas características, las cuales difieren en cierta medida con las características generales de un probiótico usado en animales terrestres. Merrifield *et al.* (2010) hacen una revisión de las características favorables para la selección de probióticos potenciales para este fin. Los criterios esenciales son: 1) Los probióticos no deben ser patógenos, no solo con respecto a la especie hospedera sino también con respecto a los animales acuáticos en general y los consumidores humanos; 2) deben estar libres de genes de resistencia a los antibióticos codificados por plásmidos y 3) deben ser resistentes a las sales biliares y un pH bajo. Como criterios favorables los probióticos deben: 1) poder adherirse y/o crecer bien dentro de la mucosa intestinal; 2) ser capaces de colonizar la superficie epitelial intestinal; 3) registrarse para su uso como aditivo alimentario; 4) mostrar características de crecimiento ventajosas (por ejemplo, corto período de demora, un corto tiempo de duplicación) y/o crecimiento a temperaturas de crianza del hospedero; 5) exhibir propiedades antagónicas hacia uno o más patógenos clave. (e.g. *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Yersinia ruckeri*, altamente patógenas para los salmónidos); 6) producir enzimas digestivas extracelulares relevantes (e.g. quitinasa, si se incorporan a la dieta ingredientes ricos en quitina, o celulosa, si la dieta es rica en ingredientes vegetales; 7) ser autóctono del hospedero o del entorno de crianza; 8) ser viable en condiciones normales de almacenamiento y lo suficientemente robusto para sobrevivir los procesos de producción de los alimentos a nivel industrial.

7- Probióticos utilizados en el cultivo de peces

Así como en otras áreas de la producción alimenticia, en acuicultura también se han utilizado ciertos probióticos en el alimento como : *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus cereus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. toyoi*, *Bifidobacterium bifidum*, *Brochothrix thermosphacta*, *Pediococcus acidilactici*, *Aeromonas sobria*, *Carnobacterium*, *Clostridium*

butyricum, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus faecium*, *S.thermophilus*, *Shewanella putrefaciens*, *Debaryomyces hansenii* y *Saccharomyces cerevisiae*.

7.1 Efectos del uso de probióticos en el cultivo de peces de agua dulce, marinos y eurihalinos

En peces de agua dulce, marinos y eurihalinos se han aplicado probióticos de origen autóctono o alóctono en períodos de entre 2 semanas y 2 meses. La mayoría de los probióticos suministrados son de origen alóctono, es decir, son adquiridos de empresas comerciales, de colecciones de instituciones de investigación, o bien, de la misma especie pero aislados en otra época y/o en otro sitio de muestreo. Los estudios en peces de agua dulce indican que sólo el 30% de los probióticos utilizados son de origen autóctono, los cuales han sido aislados del intestino de peces y aplicados a los mismos para determinar así sus efectos.

Los probióticos que se han aislado de la microbiota autóctona y aplicado a peces con importancia comercial han sido las bacterias *Carnobacterium* sp., *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas* M162, *Pseudomonas* spp., bacterias ácido lácticas (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Los mejores efectos de estos probióticos se han observado, en la mayoría de los casos, cuando se aplican en conjunto (i.e. mezcla de dos o más especies), incrementando actividades enzimáticas, en particular de enzimas digestivas, y aumentando el crecimiento y la supervivencia de los peces.

Para el caso de probióticos alóctonos, adquiridos de empresas comerciales, los mejores efectos también ocurren cuando son aplicados en conjunto de dos o más microorganismos. Sin embargo, hay estudios donde la aplicación de un solo probiótico comercial causa múltiples efectos favorables a los peces alimentados con estos microorganismos. Por ejemplo al aplicarse *Lactobacillus acidophilus* al bagre africano *Clarias gariepinus*, se obtuvo mayor crecimiento, supervivencia, producción de eritrocitos y de glóbulos blancos, así como mayor producción de iones de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Cl^- (Al-Dohail, *et al.* 2009). Otro ejemplo es el probiótico *Pediococcus acidilactici* suministrado a la tilapia *Oreochromis niloticus* que provoca mejoras en la supervivencia y la respuesta inmune, e incrementa la presencia de bacterias ácido lácticas dentro del intestino (Ferguson, *et al.* 2010; Standen, *et al.* 2013).

Respecto a los métodos de aplicación, estos se pueden considerar adecuados, mientras la dosis sea apropiada y se hagan pruebas de viabilidad después de aplicarlos a las dietas.

8- Potencial del uso de probióticos en acuicultura de peces en México

En México, la producción de peces de agua dulce por medio de la acuicultura ha ido a la alza en los últimos años. Los peces que destacan son la tilapia (*Oreochromis niloticus*), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y las carpas común y herbívora (*Cyprinus carpio* y *Ctenopharyngodon idella*, respectivamente). Aunque la producción acuícola de estos peces ha ido incrementándose a través de los años, aún existe mucho potencial para que esta producción crezca aún más. Una opción viable de mejora, es la aplicación de probióticos a las dietas del alimento que se otorga a estas especies en cultivo en las distintas granjas del país. En diferentes estudios realizados en el extranjero y sólo tres en México (Lara-Flores, *et al.* 2003 y 2010; Lara-Flores y Olvera-Novoa, 2013), en donde se aplicaron probióticos a especies que se cultivan en México, se ha demostrado que los probióticos mejoran principalmente el crecimiento y la supervivencia, lo que en la industria acuícola es claramente reflejado en ganancia económica. Por otro lado, el uso de probióticos también se pudiera aplicar a especies de peces endémicas con alto potencial acuícola como el pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor* y la acúmara *Algansea lacustris*, entre otras muchas especies.

En las tablas 1 y 2 se presenta una síntesis de los trabajos llevados a cabo hasta el momento con probióticos autóctonos y alóctonos y sus efectos en peces de agua dulce y marinos de importancia comercial.

Tabla 1. Estudios con el uso de probióticos autóctonos y alóctonos y sus efectos en peces de agua dulce con importancia comercial.

Especie	Probiótico	Concentración	Origen (autóctono/ alóctono)	Tiempo de Aplicación	Efecto	Referencia
<i>Salmo salar</i> y trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Carnobacterium</i> sp.	5×10 ⁷ células/g	Autóctono	14 días	↓Bacterias patógenas	Robertson, <i>et al.</i> , 2000
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Streptococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.1%	Alóctono (comercial)	63 días	↑Crecimiento y supervivencia	Lara-Flores, <i>et al.</i> , 2003
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM 1136	2.45×10 ⁹ y 1.07×10 ¹¹ UFC/g	Alóctono	30 días	↑Actividad fagocítica y de lisozima	Panigrahi, <i>et al.</i> , 2004
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> B26 C. <i>divergens</i> B33	10 ⁷ células/g	Autóctono	14 días	↑Actividad fagocítica en B26 ↑Actividad de lisozima en B33	Kim y Austin, 2006
<i>Cyprinus carpio</i>	Bacteria fotosintética, <i>Bacillus</i> sp. y mezcla de bacterias	1g/kg	Autóctono	60 días	↑Crecimiento ↑Actividad enzimática (proteasa, amilasa y lipasa)	Wang y Xu, 2006
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Lactobacillus sakei</i>	10 ⁶ UFC/g	Alóctono (aislada de salmónidos)	14 días	↑Actividad fagocítica y de bacterias ácido lácticas	Balcázar, <i>et al.</i> , 2007
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> y mezcla de <i>B. subtilis</i> , <i>L. acidophilus</i>	10 ⁷ células/mL	Alóctono (comercial)	28 días	↑Crecimiento ↑Supervivencia en mezcla ↑Actividad de lisozima	Aly, <i>et al.</i> , 2008
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	10 ⁸ -10 ⁹ UFC/g	Alóctono (comercial)	63 días	↑Crecimiento y supervivencia	Bagheri, <i>et al.</i> , 2008
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Aeromonas sobria</i> <i>Brochothrix thermosphacta</i>	10 ⁸ -10 ¹⁰ células/g	Alóctono)	14 días	↑Supervivencia	Pieters, <i>et al.</i> , 2008

Raggi Hoyos, L., Amillano Cisneros, M., Navarrete Ramírez, P., Ríos Durán, M.G., Martínez Chávez, C., Pedroza Islas, R y Martínez-Palacios, 2019. Presente y Futuro de los Probióticos en la Nutrición de Peces y la Modulación de su Microbiota. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Gaxiola Cortes, M.G. y M.Olvera-Novoa (Eds), Revisión en Nutrición de Organismos Acuáticos, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-1268-3, pp. 428-457.

<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	10 ⁷ UFC/g	Alóctono	30 días	↑Supervivencia	Vendrell, <i>et al.</i> , 2008
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Pseudomonas</i> spp.	10 ⁷ células/g	Autóctono	90 días	↑Crecimiento, ↑supervivencia y ↑eritrocitos en <i>M. luteus</i>	Abd El-Rhman, <i>et al.</i> , 2009
<i>Clarias gariepinus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3.01×10 ⁷ UFC/g	Alóctono	84 días	↑Crecimiento, ↑supervivencia, ↑eritrocitos, glóbulos blancos, ↑ iones de Ca ²⁺ , Mg ²⁺ y Cl ⁻	Al-Dohail, <i>et al.</i> , 2009
<i>Oreochromis niloticus</i>	Probiótico comercial Biogen®	0.3%	Alóctono	98 días	↑Crecimiento	Mehrim, 2009
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> NIOFSD017, <i>Lactobacillus plantarum</i> NIOFSD018, mezcla de bacterias, <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> NIOFSD019	10 ⁷ y 10 ⁴ UFC/g	Autóctono	60 días	↑Crecimiento ↑Actividad enzimática (amilasa, proteasa y lipasa) en bacterias ↑Actividad amilasa en <i>S. cerevisiae</i>	Essa, <i>et al.</i> , 2010
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	10 ⁷ UFC/g	Alóctono (comercial)	32 días	↑Supervivencia ↑Actividad enzimática (lisozima) ↑Bacterias ácido lácticas (conteo por medio MRS)	Ferguson, <i>et al.</i> , 2010
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Pseudomonas</i> M162	2×10 ⁹ UFC/g	Autóctono	14 días	↑Supervivencia y actividad de leucocitos y lisozima	Korkea-aho, <i>et al.</i> , 2012
<i>Labeo rohita</i>	Mezcla de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Lactococcus lactis</i> , mezcla de <i>L.</i> <i>lactis</i> y <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> , mezcla de <i>B.</i> <i>subtilis</i> y <i>S. cerevisiae</i> y mezcla de <i>B. subtilis</i> , <i>L. lactis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	10 ¹¹ UFC/kg	Alóctono	60 días	↑Crecimiento y digestibilidad en mezcla de <i>B. subtilis</i> , <i>L. lactis</i> y <i>S. cerevisiae</i> ↑Actividad enzimática (proteasa y lipasa) en todas las mezclas	Mohapatra, <i>et al.</i> , 2012

<i>Ctenopharyngodon idella</i>	<i>Bacillus subtilis</i> Ch9	1×10^9 , 3×10^9 y 5×10^9 UFC/kg	Alóctono	56 días	↑Crecimiento ↑Bacterias autóctonas <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i> <i>B. subtilis</i> (3×10^9 y 5×10^9 UFC/kg) ↑actividad enzimática (proteasa, amilasa y lipasa)	Wu, <i>et al.</i> , 2012
<i>Labeo rohita</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> VSG3	10^6 , 10^8 y 10^{10} UFC/g	Alóctono)	60 días	↑Crecimiento, supervivencia y actividad de lisozima	Giri, <i>et al.</i> , 2013
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	2.81×10^6 UFC/g	Alóctono (comercial)	42 días	↑Respuesta inmune (expresión de citocina proinflamatoria TNFa) y neutrófilos	Standen, <i>et al.</i> , 2013
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7×10^4 , 8×10^5 , 1×10^5 y 4.2×10^6 células/g	Alóctono	98 días	↑Crecimiento y supervivencia	Ayyat, <i>et al.</i> , 2014
<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	1×10^7 , 2×10^7 y 4×10^7 UFC/g	Alóctono Dong y Cai 2001)	45 días	↑Crecimiento	Xu, <i>et al.</i> , 2014
<i>Acipenser baerii</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/g	Alóctono	56 días	↑Crecimiento en 10^8	Pourgholam, <i>et al.</i> , 2015
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> y <i>Pediococcus acidilactici</i> (AquaStar® Growout)	5g/kg	Alóctono	56 días	↑ Longitud y densidad de microvellosidades ↑Leucocitos ↑Bacterias ácido lácticas	Standen, <i>et al.</i> , 2015
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> AH 78	0.5%, 1% y 2%	Alóctono	40 días	<i>L. plantarum</i> 1% ↑crecimiento	Hamdan, <i>et al.</i> , 2016
<i>Rutilus kutum</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1×10^9 , 2×10^9 y 3×10^9 UFC/kg	Alóctono (comercial)	56 días	↑Crecimiento y supervivencia	Valipour, <i>et al.</i> , 2016

Larva pez zebra <i>Danio rerio</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Liberado en el agua 10 ⁶ UFC/mL	Alóctono	8 días	↓Apetito ↑Longitud de enterocitos y microvellosidades ↑ <i>Lactobacillus</i> y <i>Streptococcus</i>	Falcinelli, <i>et al.</i> , 2016
<i>Labeo rohita</i>	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	10 ⁷ UFC/g	Alóctono	60 días	↑Crecimiento y supervivencia	Munirasu, <i>et al.</i> , 2017
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM1136 y <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM5805	10 ⁸ UFC/g	Alóctono	42 días	↑Crecimiento y supervivencia en <i>L. lactis</i>	Xia, <i>et al.</i> , 2018
<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10 ³ , 10 ⁵ , 10 ⁷ y 10 ⁹ UFC/g	Alóctono	84 días	↑Crecimiento en 10 ⁵ y 10 ⁷ Supervivencia 100% en 10 ³ , 10 ⁵ y 10 ⁷ ↑Enzimas digestivas en 10 ⁷ ↑Bacterias ácido lácticas ↑Longitud de microvellosidades en 10 ⁵ y 10 ⁷	Akter, <i>et al.</i> , 2019
Juvenil trucha arcoíris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Lactobacillus delbrukei</i> subsp. <i>b</i> <i>ulgaricus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> y <i>Citrobacter farmeri</i>	5X10 ⁷ UFC/g	Autóctono	60 días	↑Crecimiento con <i>L. acidophilus</i> y <i>L. bulgaricus</i>	Mohammadian, <i>et al.</i> , 2019
Rohu <i>Labeo rohita</i>	<i>Bacillus</i> spp.	10 ⁷ células/g	Autóctono	60 días	↑Crecimiento en combinación de <i>B. methylotrophicus</i> y <i>B. licheniformis</i>	Mukherjee, <i>et al.</i> , 2019
Cachama o pacú negro <i>Colossoma macropomum</i>	<i>Bacillus cereus</i>	4.2X10 ⁴ , 3.9X10 ⁶ y 3.3X10 ⁸ UFC/g)	Autóctono	120 días	↑Crecimiento y supervivencia	Dias, <i>et al.</i> , 2018
Guarupaya <i>Astyanax bimaculatus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	≥1 X10 ⁷ UFC/g	Autóctono	90 días	↑Supervivencia	Vieira de Moraes, <i>et al.</i> , 2018

Carpa <i>Cyprinus carpio</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0.1X10 ⁵ , 1X10 ⁶ y 1X10 ⁷ CFU/g	Alóctono	56 días	↑Crecimiento en 1X10 ⁶	Zhang, <i>et al.</i> , 2019
Carpín dorado <i>Carassius auratus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	3X10 ⁷ CFU/g	Alóctono	98 días	↑Crecimiento	Ahire, <i>et al.</i> , 2018
Tilapia <i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> L-137	10, 20 y 50 ppm en el alimento	Alóctono	150 días	↑Crecimiento en 50 ppm	Van- <i>Nguyen, et al.</i> , 2019
Juvenil pez blanco <i>Chirostoma estor</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , inulina (prebiótico), <i>L.</i> <i>acidophilus</i> + inulina (synbiotic)	<i>L. acidophilus</i> incorporado a dieta 10 ⁶ UFC/g Inulina 2% de la dieta	Alóctono	84 días	↑Crecimiento en dieta con inulina + <i>L.</i> <i>acidophilus</i> ↑ <i>Lactobacillus</i>	Datos no publicados
Larva pez blanco <i>Chirostoma estor</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i>	Incorporado a microdieta 0.1%, 0.5%, 0.1%/0.1% y 0.5%/0.5%	Alóctono	30 días	↑Crecimiento en <i>L. acidophilus</i> 0.1 y 0.5% y combinación de <i>L. acidophilus</i> y <i>L. plantarum</i> 0.5%/0.5%	Datos no publicados

Los símbolos representan incremento (↑) o decremento (↓) en los parámetros de crecimiento, supervivencia, respuesta inmune, secreción de enzimas digestivas, producción de micronutrientes, modulación del intestino (microvellosidades), bacterias ácido lácticas, y bacterias patógenas relativos al control.

Tabla 2. Estudios con el uso de probióticos autóctonos y alóctonos y sus efectos en peces marinos con importancia comercial.

Especie	Probiótico	Concentración	Origen (autóctono/alóctono)	Tiempo de Aplicación	Efecto	Referencia
<i>Dentex dentex</i>	<i>Bacillus toyoi</i> <i>Bacillus cereus</i>	0.05, 0.1 y 0.2%	Alóctono (<i>B. toyoi</i> aislado del suelo)	42 días	↑Supervivencia	Hidalgo, <i>et al.</i> , 2006
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Mezcla compuesta por <i>Bacillus subtilis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Clostridium butyricum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.6×10^7 , 1.2×10^8 , 2×10^7 y 1.6×10^7 UFC/g	Alóctono (comercial)	50 días	↑Supervivencia y actividad de lisozima	Taoka, <i>et al.</i> , 2006
<i>Solea senegalensis</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>	10^9 UFC/g	Alóctono (aislado de dorada <i>Sparus aurata</i>)	60 días	↑Crecimiento	De Rodríguez <i>et al.</i> , 2009
<i>Argyrosomus regius</i> y sargo <i>Diplodus sargus</i>	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1 y 2 %	Alóctono	28 días	↑Actividad enzimática (proteasa y amilasa) en sargo	Castro, <i>et al.</i> , 2013
<i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> BFE920 y <i>Lactobacillus plantarum</i> FGL0001	$\log_{10} 7.0$ CFU/g	<i>L. lactis</i> (aislada de soja) y <i>L. plantarum</i> (autóctono)	30 días	↑Crecimiento	Beck, <i>et al.</i> , 2015

<i>Pagrus major</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> y mezcla de <i>L. rhamnosus</i> y <i>L. lactis</i>	10 ⁶ UFC/g	Alóctona (<i>L. rhamnosus</i>)	56 días	↑Crecimiento ↑Bacterias ácido lácticas (conteo por medio MRS)	Dawood, <i>et al.</i> , 2016
<i>Pampus argenteus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Clostridium butyricum</i>	10 ⁸ UFC/g	Alóctono: <i>B. subtilis</i> y <i>L. plantarum</i>	60 días	↑Crecimiento ↑Actividad enzimática (proteasa, lipasa y amilasa) ↑Actividad de lisozima	Gao, <i>et al.</i> , 2016
Mero <i>Epinephelus lanceolatus</i> ♂ y <i>E. fuscoguttatus</i> ♀	<i>Bacillus velezensis</i> K2	10 ⁷ UFC/g	Autóctono	28 días	↑Supervivencia contra reto de infección con <i>Vibrio harveyi</i>	Li, <i>et al.</i> , 2019
Lenguado <i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> SK3927, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SK4079, and <i>Bacillus subtilis</i> SK4082, <i>Lactobacillus brevis</i> SK1751, <i>Lactobacillus plantarum</i> SK349 y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SK3587	10 ⁸ -10 ⁹ UFC/kg	Autóctono y alóctono (consorcio)	84 días	↑Actividad de lisozima	Kai-Min, <i>et al.</i> , 2019
Larvas de lenguado <i>Scophthalmus maximus</i>	<i>Roseobacter</i> sp.	10 ⁷ UFC/mL	Autóctono	5 días	↑Supervivencia	Hjelm, <i>et al.</i> , 2004
Larvas de dorada <i>Sparus aurata</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	15 ppm/m ³	Alóctono	35 días	↑Actividad enzimática (proteasa, amilasa y lipasa) en los tres tratamientos	Suzer, <i>et al.</i> , 2008

					↑Crecimiento y supervivencia en tratamiento <i>Lactobacillus</i> spp. con rotífero, artemia y agua	
Larvas de lenguado <i>Solea senegalensis</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	2.5X10 ⁷ UFC/mL	Alóctono	121 días	↑Crecimiento	Lobo, <i>et al.</i> , 2013
Larva de róbalo blanco <i>Centropomus undecimalis</i>	<i>B. licheniformis</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i>	Incorporado usando rotífero y Artemia10 ¹⁰ UFC/g y liberado en el agua 1.1X10 ⁵ UFC/mL	Alóctono	28 días	↑Supervivencia	Tarnecki, <i>et al.</i> , 2019

Los símbolos representan incremento (↑) o decremento (↓) en los parámetros de crecimiento, supervivencia, respuesta inmune, secreción de enzimas digestivas, producción de micronutrientes, modulación del intestino (microvellosidades), bacterias ácido lácticas, y bacterias patógenas relativos al control.

Existe poca información acerca del efecto del uso de probióticos en alimentos para larvas de peces cultivados, debido a que las larvas de muchas especies de peces, sobre todo marinos, no aceptan o no responden con éxito a dietas formuladas en las que se puedan incluir los probióticos. Por tal motivo, en los pocos trabajos realizados en larvas de peces marinos (tabla 2) se han utilizado alimentos vivos como vectores o los probióticos directamente en el agua. El desarrollo de dietas micro agregadas o micro encapsuladas apropiadas para las larvas permitirá evaluar el efecto de los probióticos en estas etapas en las que se presentan altas mortalidades. El uso de micro agregados y micro encapsulados alimenticios con y sin prebióticos que estimulen a los probióticos y a la microbiota, son un excelente vehículo para hacer llegar las cargas probióticas a larvas, e incluso juveniles, de peces en cultivo. En el caso de larvas de pez blanco *C. estor* se realizó un estudio con la inclusión de probióticos en dietas microencapsuladas, obteniendo efectos benéficos en el crecimiento (Datos no publicados, Tabla 2).

9- La microbiota de peces

Estudios microbiómicos en peces (amplia revisión en Tarnecki *et al.*, 2017), han mostrado la importancia de la microbiota en el desarrollo y salud de los peces, principalmente a través de la interacción con el sistema inmunológico. Todos los peces (en su ambiente natural y también cultivados), cuentan con una microbiota o comunidad de microorganismos basal (autóctona) y transitoria (alóctona), la cual cambia o se modula con la edad, el estatus nutricional, las condiciones ambientales y la dieta. La microbiota más abundante es la intestinal y la que más influencia tiene sobre el hospedero. La microbiota se ha descrito en varias especies de peces y se ha correlacionado con la salud y el crecimiento de los mismos. ¿Qué tan importante es la microbiota en un pez sin estómago como *C. estor*? Esta es una de las preguntas principales que pretendemos responder en nuestro laboratorio con un modelo de pez particular: sin estómago y con intestino corto, pues es posible que en modelos como estos la microbiota tenga un papel fundamental.

10- Efecto nutrigenómico de los probióticos en peces

Como ya se ha mencionado, el uso de probióticos en peces de cultivo ha ido incrementando debido a los buenos resultados en el desempeño de los organismos. La evaluación y validación del efecto de probióticos a nivel nutrigenómico en los peces es algo que se encuentra en proceso.

En las especies de peces en donde se ha determinado la modificación de la expresión de genes debido a un tratamiento con probióticos son escasos y en la mayoría de los trabajos, se han enfocado en la respuesta a nivel del sistema inmune, debido a que se han reportado efectos como el aumento de la inmunidad, digestibilidad y la resistencia a enfermedades bacterianas patógenas infecciosas en varias especies de peces (Biswas *et al.*, 2013; Beck *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2017; Hasan *et al.*, 2019; Niu *et al.*, 2019).

De manera general, la suplementación probiótica aumenta los niveles de transcripción de genes que tienen que ver con procesos pro-inflamatorios, como las citosinas (Hasan *et al.*, 2018); el aumento en la expresión de citosinas pro-inflamatorias está asociado a un mejor estado inmunológico en peces y por lo tanto se presenta una mejor resistencia contra patógenos (Kim *et al.*, 2006; Panigrahi *et al.*, 2007; Pirarat *et al.*, 2011; Hasan *et al.*, 2019; Jang *et al.*, 2019).

Algunos probióticos, como las bacterias ácido lácticas, han sido estudiadas de manera individual, puesto que incrementan las actividades enzimáticas del sistema digestivo, aumentan el crecimiento de los organismos y hay una mejor utilización del alimento, lo cual se ha correlacionado con la expresión de algunos genes puntuales (Jami *et al.*, 2019); sin embargo, también se ha observado que la combinación de cepas probióticas (consorcios bacterianos) presenta resultados relevantes e incluso mejores, a nivel de expresión génica, que usando solo una cepa (Giri *et al.*, 2014; Beck *et al.*, 2015; Lazado *et al.*, 2015).

Existen trabajos que muestran la regulación de algunos genes involucrados en el crecimiento, en donde se observa una correlación entre el aumento en el crecimiento de los organismos con la expresión de genes involucrados en este proceso (Wang, *et al.*, 2018; Qi *et al.*, 2009; Mohammadian *et al.*, 2019). La gran parte de estos estudios han cuantificado la expresión de sólo algunos genes y no existen trabajos en donde se observe el efecto génico global (transcriptoma) de los probióticos suministrados a los peces.

Aunque a la fecha se ha logrado analizar algunos de los efectos de la suplementación de probióticos en los peces, aún no es claro como es el mecanismo de acción dentro del organismo y se requieren generar métodos confiables de validez de los efectos.

Trabajos en donde se evalúe el holo-metatrascriptoma de los organismos, nos darán más información necesaria para un mejor entendimiento de la acción y resultados de los probióticos en los peces, debido a que se puede observar la expresión de los genes implicados en diferentes procesos metabólicos y mecanismos fisiológicos. Lo anterior para una mejor selección y funcionamiento de las cepas probióticas en un cultivo exitoso de diferentes especies de peces.

11- Estudios ómicos realizados en el pez blanco *Chirostoma estor*

Chirostoma estor es un pez de interés nutricional y biológico, debido a su capacidad de acumular grandes cantidades de DHA (ácido docohexaenóico en sus tejidos (~30%)) (Fonseca-Madrigal *et al.*, 2014), proporciones semejantes a los del salmón y el atún. Sin embargo, a diferencia de estos, esta especie sintetiza *de novo* el DHA, a partir de alfa linolénico por la ruta de la enzima delta 4, y es una especie más sustentable al ser zooplanctófaga, situándose en los primeros escalones de la cadena trófica. Por otro lado, *C. estor* presenta un modelo digestivo diferente, debido a la ausencia de estómago y a la presencia de un intestino corto (<LT pez), por lo que es un excelente modelo para estudiar la importancia del microbioma en peces. Lo anterior nos ha llevado a comenzar a estudiar a *C. estor* desde la perspectiva del holobionte a través de las ciencias ómicas. Esto es, por un

lado la genómica transcriptómica del pez y por el otro la metagenómica de la microbiota del intestino del mismo. En el primer nivel de análisis de la microbiota, se ha hecho la metagenómica basada en los amplicones de la región variable V3 del 16S rRNA. Obtuvimos la línea base de la comunidad microbiana y los resultados muestran la presencia conspicua de los géneros bacterianos *Lactobacillus* spp., *Aeromonas* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. y pertenecientes a los filas cianobacteria y actinobacteria (Fig. 3), géneros interesantes por los metabolitos y enzimas que pudieran producir.

Un primer experimento para empezar a conocer los efectos y mecanismos de acción de los probióticos en el holobionte, se basó en agregar como probiótico *Lactobacillus acidophilus* e inulina como prebiótico. Los resultados de este experimento mostraron que después de 12 semanas los peces con dieta suplementada con ambos, pre- y probiótico, tuvieron un mayor crecimiento, y con respecto a la microbiota, ésta también fue modulada, y se observa la aparición y la predominancia de *L. acidophilus* en estos peces (Figura 3).

Nuestro siguiente análisis será el metatranscriptómico, para adentrarnos en los posibles roles de la microbiota y sus interacciones con el hospedero.

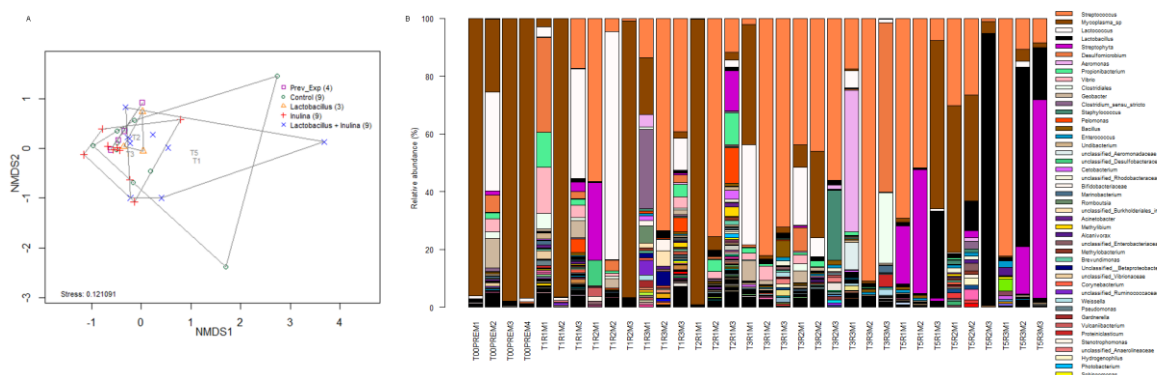


Figura 3. NMDS y perfil microbianos. En (A) se muestra un análisis multidimensional no paramétrico (NMDS) en donde se observan las muestras en cada tratamiento, basado en los perfiles microbianos que se observan en la gráfica de barras (B).

Conclusiones

La aplicación de tecnologías recientes y avanzadas, como la microencapsulación, la inclusión de aditivos alimenticios y los materiales de envasado, para incluir probióticos en alimentos y protegerlos durante el procesamiento y almacenamiento, así como garantizar su viabilidad en el agua, han permitido que estos microorganismos sobrevivan mejor y puedan ser ofrecidos a los peces de una manera segura y eficiente (Tripathi y Giri, 2014). Se debe considerar qué especie o cepa probiótica es la indicada de acuerdo a los métodos de procesamiento, inclusión y almacenamiento disponibles. Con respecto a los efectos de los probióticos, considerando su origen, en estudios de peces de diferentes ambientes, no se han encontrado diferencias, puesto que probióticos autóctonos o aloctónos (i.e. comerciales) causan efectos positivos en su mayoría, respecto al crecimiento, la supervivencia, la respuesta inmune, la producción de enzimas digestivas, la estructura del intestino y la modulación de la microbiota intestinal. No obstante, al aplicarse probióticos de forma combinada, ya sean de origen autóctono o aloctono, se incrementa el número de efectos benéficos que estos causan en los peces.

El uso de probióticos autóctonos ha sido un gran éxito en las especies en donde se han utilizado, sin embargo, deberá realizarse mayor investigación para el uso de estos probióticos con el fin de que la biotecnología se afine y permita obtener mejores resultados. Los probióticos en consorcio (i.e. grupos de bacterias y otros microorganismos probióticos autóctonos y/o aloctónos), adicionados con diferentes mezclas de prebióticos, tendrán que ser investigados para, en un futuro, utilizarlos con éxito e incrementar crecimientos, estimular el sistema inmune para reducir ventajosamente la mortalidad y el uso indiscriminado de antibióticos. Lo anterior permitirá incrementos notables en la supervivencia y eficiencia alimenticia, sobre todo en etapas larvarias, en donde las mortalidades son muy elevadas.

Por otro lado las investigaciones futuras requerirán del estudio holo-metatrascriptómico, para conocer los mecanismos de acción de los probióticos en los holobiontes.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer el trabajo Técnico de la Maestra Sibila Concha Santos, Jesús López García, Guadalupe Pámanes Morales, Guadalupe Cortés Ortiz y Perla Hernández Rosas, además del apoyo del CONACyT-Laboratorios Nacionales a través del Proyecto No. 299055 LANMDA-2019 y Los Proyectos de la Coordinación de la Investigación científica (CIC) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Referencias

- Abd El-Rhman A. M., Khattab Y. A. E., Shalaby A. M. E. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 2009; 27, 175–180.
- Ahire J. J., Mokashe N. U., Chaudhari B. L. Effect of Dietary Probiotic *Lactobacillus helveticus* on Growth Performance, Antioxidant Levels, and Absorption of Essential Trace Elements in Goldfish (*Carassius auratus*). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2018; <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9428-5>
- Akter M. N., Hashim R., Sutriana A., Siti-Azizah M. N., Asaduzzaman M. 2019. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation on growth performances, digestive enzyme activities and gut histomorphology of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878) juveniles. *Aquaculture Research*. 1–12.
- Al-Dohail M A, Hashim R, Aliyu-Paiko M. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. *Aquaculture Research* 2009; 40: 1642-1652.
- Aly S. M., Ahmed Y. A., Ghareeb A. A., Mohamed M. F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology* 2008; 25, 128-136.
- Ashley P J. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science* 2007; 104: 199–235.
- Ayyat M. S., Labib H. M., Mahmoud H. K. A. Probiotic Cocktail as a Growth Promoter in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Aquaculture* 2014; 26, 208–215.
- Bagheri T., Aliakbar-Hedayati S., Yavari V., Alizade M., Farzanfar A. Growth, Survival and Gut Microbial Load of Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) Fry Given Diet Supplemented with Probiotic during the Two Months of First Feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 2008; 8, 43-48.
- Balcázar J. L., De Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Vendrell D., Gironés O., Muzquiz J. L. Enhancement of the immuneresponse and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2007; 51, 185–193.
- Beck B. R., Kim D., Jeon J., Lee S. M., Kim H. K., Kim O. J., Lee J. II., Suh B. S., Do H. K., Lee K. H., Holzapfel W. H., Hwang J. Y., Kwon M. G., Song S. K. The effects of combined dietary probiotics *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 on innate immunity and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology* 2015; 42, 177-183.

- Biswas G., Korenaga H., Nagamine R., Takayama H., Kawahara S., Takeda S., et al. Cytokine responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) head kidney cells induced with heat-killed probiotics isolated from the Mongolian dairy products. *Fish Shellfish Immunol* 2013; 34, 1170–1177.
- Boylston T D, Vinderola C G, Ghoddusi H B, Reinheimer J A. Incorporation of Bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. *International Dairy Journal* 2004; 14: 375–387.
- Burgain J J, Gaiani C C, Linder M R, Scher J J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering* 2011; 104(4): 467–483.
- Cabello F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 2006; 8: 1137–1144.
- Castro C., Pérez-Jiménez A., Coutinho F., Pousão-Ferreira P., Brandão T. M., Oliva-Teles A., Peres H. Digestive enzymes of meagre (*Argyrosomus regius*) and white seabream (*Diplodus sargus*). Effects of dietary brewers spent yeast supplementation. *Aquaculture* 2013; 416, 322-327. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.09.042
- Dawood M. A., Koshio S., Ishikawa M., Yokoyama S. Effects of partial substitution of fish meal by soybean meal with or without heat-killed *Lactobacillus plantarum* (LP20) on growth performance, digestibility, and immune response of amberjack, *Seriola dumerili* juveniles. *BioMed research international* 2016; 215, 1-11. doi:10.1155/2015/51419
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca Edición 2017. Mazatlán, Sinaloa. 2017. 293.
- De Rodríguez M. S., Díaz-Rosales P., Chabrilón M., Smidt H., Arijó S., León-Rubio J. M., Alarcón F. J., Balebona M. C., Moriño M. A., Cara J. B., Moyano F. J. 2009. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition*, 15, 177-185.
- Dias J. A. R., Abe H. A., Sousa N. C., Couto M. V. S., Cordeiro C. A. M., Meneses J. O., Cunha F. S., Mouriño J. L. P., Martins M. L., Barbas L. A. L., Carneiro P. C. F., Maria A. N., Fujimoto R. Y. Dietary supplementation with autochthonous *Bacillus cereus* improves growth performance and survival in tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquaculture Research* 2018; 49, 3063–3070.
- Ding W K, Shah N P. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science* 2007; 72(9): M446–M450.
- Essa M. A., El-Serafy S. S., El-Ezabi M. M., Daboor S. M., Esmael N. A., Lall S. P. Effect of Different Dietary Probiotics on Growth, Feed Utilization and Digestive Enzymes Activities of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the Arabian Aquaculture Society* 2010; 5, 143-162.
- Falcinelli S., Rodiles A., Unniappan S., Picchietti S., Gioacchini G., Merrifield D. L., Carnevali O. 2016. Probiotic treatment reduces appetite and glucose level in the zebrafish model. *Scientific Reports*, 6, 1-13. DOI: 10.1038/srep18061

- FAO/WHO. Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Roma, Italia. 2006. 50.
- FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Roma, Italia. 2018. 233.
- FAO. Fats and fatty acids in human nutrition: Report of an expert consultation. Roma, Italia. 2010. 166.
- Ferguson R M W, Merrifield D L, Harper G M, Rawling M D, Mustafa S, Picchietti S, *et al.* The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology* 2010; 109: 851–862.
- Ganguly N. K., Bhattacharya S. K., Sesikera B., Nair G. B., Ramakrishna B. S., Sachdev H. P. S., Batish V. K., Kanagasabapathy A. S., Muthuswamy V., Kathuria S. C., Katoch V. M., Satyanarayana K., Toteja G. S., Rahi M., Rao S., Bhan M. K., Kapur R., Hemalatha R. FAO/WHO. (2011) ICMR-DBT Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food. *Indian Journal of Medical Research* 2011; 134, 22–25.
- Gardiner G E, Bouchier P, O’Sullivan E, Kelly J, Kevin Collins J, Fitzgerald G. A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. *International Dairy Journal* 2002; 12(9): 749–756.
- Gao Q., Xiao C., Min M., Zhang C., Peng S., Shi Z. Effects of probiotics dietary supplementation on growth performance, innate immunity and digestive enzymes of silver pomfret, *Pampus argenteus*. *Indian Journal of Animal Research* 2016; 50 (6), 936–941.
- Giri S. S., Sukumaran V., Oviya M. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish & Shellfish Immunology* 2013; 34, 660–666.
- Giri S.S., Sukumaran V., Sen S.S., Jena P.K. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Bacillus subtilis* VSG1 singularly or in combination with *Lactobacillus plantarum* VSG3 or/and *Pseudomonas aeruginosa* VSG2 on the growth, immunity and disease resistance of *Labeo rohita*. *Aquacult. Nutr.* 2014; 20, 163–171.
- Grafton, C. Daugbjerg, M.E. Qureshi. (2015). Towards food security by 2050. *Food Security*, 7 (2): 179–183.
- Hamdan A. M., El-Sayed A. F. M., Mahmoud M. M. Effects of a novel marine probiotic, *Lactobacillus plantarum* AH 78, on growth performance and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of applied microbiology* 2016; 120, 1061–1073.
- Hasan M.T., Jang W.J., Kim H., Lee B.J., Kim K.W., Hur S.W., Lim S.G., Bai S.C., Kong I.S. Synergistic effects of dietary *Bacillus* sp. SJ-10 plus β -glucan oligosaccharides as a synbiotic on growth performance, innate immunity and streptococcosis resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol* 2018; 82, 544–553.
- Hasan M.T., Jang W.J., Lee B.J., Kim K.W., Hur S.W., Lim S.G., Bai S.C., Kong I.S. Heat-killed *Bacillus* sp. SJ-10 probiotic acts as a growth and humoral innate immunity response enhancer in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2019; 88, 424–431.

- Hidalgo M. C., Skalli A., Abellán E., Arizcun M., Cardenete G. Dietary intake of probiotics and maslinic acid in juvenile dentex (*Dentex dentex* L.): effects on growth performance, survival and liver proteolytic activities. *Aquaculture Nutrition* 2006; 12, 256–266.
- Hjelm M., Bergh Ø., Riaza A., Nielsen J., Melchiorson J., Jensen S., Duncan H., Ahrens P., Birkbeck H., Gram L. 2004. Selection and Identification of Autochthonous Potential Probiotic Bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) Rearing Units.
- Jang W.J., Lee J.M., Hasan M.T., Lee B.J., Lim S.G., Kong I.S. Effects of probiotic supplementation of a plant-based protein diet on intestinal microbial diversity, digestive enzyme activity, intestinal structure, and immunity in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunol* 2019; 92, 719-727.
- Kim D.H., Austin B. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006;114, 297–304.
- Korkea-aho T L, Papadopoulou A, Heikkinen J, Von Wright A, Adams A, Austin B., Thompson K. D. *Pseudomonas* M162 confers protection against rainbow trout fry syndrome by stimulating immunity. *Journal of Applied Microbiology* 2012; 113, 24–35.
- Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal* 2003; 13: 3-13.
- Lara-Flores M, Olivera-Castillo L, Olivera-Novoa M A. Effect of the inclusion of a bacterial mix (*Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*), and the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth, feed utilization and intestinal enzymatic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Fisheries and Aquaculture* 2010; 2: 93-101.
- Lara-Flores M, Olivera-Novoa M A, Guzmán-Méndez B E, López-Madrid W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 2003; 216: 193–201.
- Lara-Flores M, Olivera-Novoa M A. The use of lactic acid bacteria isolated from intestinal tract of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), as growth promoters in fish fed low protein diets. *Latin American Journal of Aquatic Research* 2013; 41: 490-497.
- Lazado C.C., Caipang C.M.A., Estante E.G. Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions, *Fish Shellfish Immunol.* 2015; 45, 2–12.
- Lee BH. *Fundamentals of Food Biotechnology*. 2nd edition. Oxford: John Wiley & Sons, 2015. 518.
- Lee K Y, Heo T R. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salts solution. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; 66: 869–873.
- Li J., Wu Z. B., Zhang Z., Zha J. W., Qu S. Y., Qi X. Z., Wang G. X., Ling F. Effects of potential probiotic *Bacillus velezensis* K2 on growth, immunity and resistance to *Vibrio harveyi* infection of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀). *Fish and Shellfish Immunology* 2019; 93, 1047–1055.

- Lobo C., Moreno-Ventas X., Tapia-Paniagua S., Rodríguez C., Moriñigo M. A., García de La Banda I. Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in *Senegalese sole* larviculture. *Fish Physiology Biochemistry* 2013. DOI 10.1007/s10695-013-9844-0
- Mehrim A. I. Effect of Dietary Supplementation of Biogen (Commercial Probiotic) on Mono-Sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under Different Stocking Densities. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 2009; 4, 261-273.
- Merrifield D L, Dimitroglou A, Foey A, Davies S J, Baker R T M, Bøgwald J, et al. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 2010; 302: 1–18.
- Mohammadian T., Nasirpour M., Tabandeh M.R., Heidary A.A., Ghanei-Motlagh R., Hosseini S.S. Administrations of autochthonous probiotics altered juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* health status, growth performance and resistance to *Lactococcus garvieae*, an experimental infection. *Fish & Shellfish Immunol.* 2019; 86, 269-279.
- Mukherjee A., Chandra G., Ghosh K. Single or conjoint application of autochthonous *Bacillus* strains as potential probiotics: Effects on growth, feed utilization, immunity and disease resistance in Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture* 2019; 512, 1-15.
- Munirasu S., Ramasubramanian V., Arunkumar P. 2017. Effect of Probiotics diet on growth and biochemical performance of freshwater fish *Labeo rohita* fingerlings. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5 (3), 1374–1379.
- Nguyen T.L., Park C.I., Kim D.H. Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. *Aquaculture* 2017; 471, 113–120.
- Nguyen N. V., Onoda S., Khanh T. V., Hai P. D., Trung N. T., Hoang L., Koshio S. Evaluation of dietary Heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain L-137 supplementation on growth performance, immunity and stress resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 2019; 498, 371–379.
- Niu K.M., Khosravi S., Kothari D., Lee W.D., Lim J.M., Lee B.J., Kim K.W., Lim S.G., Lee S.M., Kim S.K. Effects of dietary multi-strain probiotics supplementation in a low fishmeal diet on growth performance, nutrient utilization, proximate composition, immune parameters, and gut microbiota of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2019; 93, 258-268.
- Panigrahi A., Kiron V., Kobayashi T., Puangkaew J., Satoh S., Sugita H. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2004; 102, 379–388.
- Panigrahi A., Kiron V., Satoh S., Hirono I., Kobayashi T., Sugita H., Puangkaew J., Aoki T. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding *Dev. Comp. Immunol.* 2007; 31, 372–382.

- Pieters N., Brunt J., Austin B., Lyndon A. R. Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 2008; 105, 723–732.
- Pirarat N., Pinpimai K., Endo M., Katagiri T., Ponpornpisit A., Chansue N., Maita M. Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Res. Vet. Sci.* 2011; 91, e92–e97.
- Pourgholam M. A., Khara H., Safari R., Yazdani-Sadati M. A., Sadegh Aramli M. 2015. Dietary Administration of *Lactobacillus plantarum* Enhanced Growth Performance and Innate Immune Response of Siberian Sturgeon, *Acipenser baerii*. Probiotics and Antimicrobial Proteins. DOI 10.1007/s12602-015-9205-7.
- Qi Z., Zhang X.H., Boon N., Bossier P. Probiotics in aquaculture of China—current state, problems and prospect. *Aquaculture* 2009; 290, 15-21.
- Robertson P., O'dowd C., Burrells C., Williams P., Austin B. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 2000; 185, 235-243.
- Standen B T, Rawling M D, Davies S J, Castex M, Foey A, Gioacchini G, *et al.* Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology* 2013; 35: 1097-1104.
- Standen B. T., Rodiles A., Peggs D. L., Davies S. J., Santos G. A., Merrifield D. L. Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2015; 99, 8403–8417.
- Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology* 2000; 62: 47–55.
- Suzer C., Çoban D., Kamaci H. O., Saka S., Firat K. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 2008; 280, 140-145.
- Tarnecki A. M., Wafapoor M., Phillips R. N., Rhody N. R. 2019. Benefits of a *Bacillus* probiotic to larval fish survival and transport stress resistance. *Scientific Reports*, 9, 4892 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39316-w>
- Taoka Y., Maeda H., Jo J., Jeon M., Bai S. C., Lee W., Yuge K., Koshio S. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fisheries Science* 2006; 72, 310–321.
- Tripathi M K, Giri S K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods* 2014; 9: 225–241.

- Valipour A. R., Hamed S. N., Abdollahpour B. H. Effects of probiotic (*Pediococcus acidilactici*) on growth and survival of kutum (*Rutilus kutum*) fingerlings. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 2016; 17, 35-46.
- Vendrell D., Balcázar J. L., De Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Gironés O., Múzquiz J. L. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 2008; 31, 337–345.
- Vieira de Moraes A., De Oliveira Pereira M., Moraes K. N., Rodrigues-Soares J. P., Alves Jesus G. F., Jatobá A. Autochthonous probiotic as growth promoter and immunomodulator for *Astyanax bimaculatus* cultured in water recirculation system. *Aquaculture Research* 2018; 49, 2808–2814.
- Wang Y., Xu Z. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology* 2006; 127, 283–292.
- Wang Y.B., Li J.R., Lin J. Probiotics in aquaculture: challenges and Outlook *Aquaculture* 2008; 281, 1-4.
- Wu Z. X., Feng X., Xie L. L., Peng X. Y., Yuan J., Chen X. X. Effect of probiotic *Bacillus subtilis* Ch9 for grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844), on growth performance, digestive enzyme activities and intestinal microflora. *Journal of Applied Ichthyology* 2012; 28, 721–727.
- Xia Y., Lu M., Chen G., Cao J., Gao F., Wang F., Liu Z., Zhu H., Yi M. 2018. Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*. doi: 10.1016/j.fsi.2018.03.020.
- Xu Y. J., Wang Y. B., Lin J. D. Use of *Bacillus coagulans* as a Dietary Probiotic for the Common Carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of World Aquaculture Society* 2014; 45, 403-411.
- Zhang C., Zhang J., Fan W., Huang M., Liu M. 2019. Effects of dietary *Lactobacillus delbrueckii* on growth performance, body composition, digestive and absorptive capacity, and gene expression of common carp (*Cyprinus carpio* Huanghe var). *Aquaculture Nutrition*, 25, 166–175.
- Ying D Y, Phoon M C, Sanguansri L, Weerakkody R, Burgar I, Augustin M A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: Relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. *Journal of Food Science* 2010; 75(9): E588–E595.
- Zivkovic R. Probiotics or microbes against microbes. *Acta Medica Croatica* 1999; 53: 23–28.