

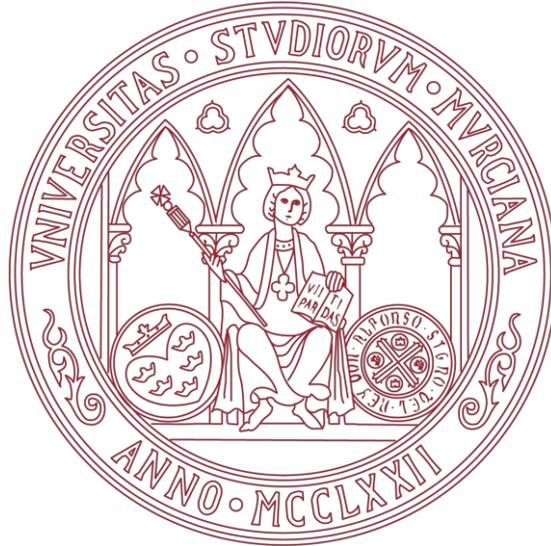


UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Análisis bioeconómico de la valorización de subproductos de la industria cervecera en dietas funcionales para una acuicultura sostenible.

D. Luciano Vílchez-Gómez
2022



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Análisis bioeconómico de la valorización de subproductos de la industria cervecera en dietas funcionales para una acuicultura sostenible.

Don Luciano Vílchez-Gómez

2019

«En todas nuestras investigaciones, la única cosa que hemos descubierto es que solo la compañía de otros hace soportable el vacío.»

“In all our searching, the only thing we've found that makes the emptiness bearable is each other.”

Carl Sagan (1.934 -1.996)

Agradecimientos

A todos aquellos que me han hecho preguntarme el porqué de las cosas.

A todos aquellos que me han ayudado a realizar la metamorfosis.

A todos aquellos que han compartido su conocimiento conmigo.

A todos mis maestros.

A mis padres y abuelos por dárme todo. A Toñi, a mis hermanos, Jesús y Estefanía.

A mis compañeros de laboratorio y acuarios por compartir todos los momentos, los malos y los buenos: Francisco Casado, María Ruiz, Rocío Piñera, Chema García, Cristóbal Espinosa, y Latifeh Chupani. A Inés Ferreira y Emanuele Conforto. A la intrusa en el grupo Amanda E. López-Cánovas. Y, sobre todo a Diana C. Ceballos-Francisco, Daniel González-Silvera y María Cámara-Ruiz.

A Virginia, Marian, y Fran, mis exigentes directores de este trabajo, por ayudarme a encontrar la motivación cuando me faltaban las fuerzas.

A Pepe Meseguer, Teresa Lozano, María Engracia Abad, Alberto Cuesta y Elena Chávez, por su orientación en mi día a día. A Alfonsa García, por abrirme siempre que me ha hecho falta la puerta de su despacho.

A Juan Antonio Calderón, maestro de maestros, y maestro de los pollitos (y peces).

A Daniel Aguilera. A todas las empresas que han colaborado desinteresadamente.

A aquellos que han compartido en algún momento este trabajo y colaborado en tareas tediosas, y a aquellos que me han facilitado la vida con su soporte técnico. Toñi Bernabéu, María Jesús Manzano y especialmente a Inmaculada Fuentes, por ser la vecina de laboratorio que todo el mundo desea tener. A María J. Paqui y la gente del Kiosko, A Alejandro y a Pascual por sus cafés «especiales». A María José y Sonia por su compañía. Al resto de personal de la Unidad Técnica (fontaneros, carpinteros, electricistas), sin ellos todo esto no habría sido posible, y mucho menos que funcionaran los acuarios.

A todos aquellos que me han acompañado en mi viaje, A Lucius Junius Moderatus Columella, Cayo Sergio Orata, Luis Morales, Alicia Prieto, Terje Lindblom, Emma McKeogh, Ana Lilia y Milton Spanopoulos, René Rebollar, Felipe do Nascimento, a Enrique Vázquez y Brian Page. Especialmente a Amelia Salinas y Mike Ma. A Pilar Garrido. A mi tío José Luis Gómez por su concienzuda revisión de estilo y sus comentarios. A mis amigos de toda la vida, no son pocos y siempre están ahí.

A la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, por unos años maravillosos, una gran familia que no cabe en esta página, gracias a todos.

Y a la música: «Mi padre quisiera, que no hubiera abandonado la carrera de abogado, Y el cura, que me arrepienta de lo que he pecado, Y el médico, que coma más pescado» (Juan Gómez "El Kanka")

A todos aquellos que siempre han creído que esto tendría un final, y a todos aquellos que pensaron lo contrario.

«Y si me he olvidado de alguien es por despiste, y no, por falta de cariño». (Juan Gómez "El Kanka")

A mis peces y a la mar.

Y a ti, la Ciencia, que has venido para quedarte y desordenarlo todo.

Proyectos

La presente memoria de tesis se presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Los trabajos y estudios compilados se han llevado a cabo en el Programa Oficial de Postgrado en Biología Molecular y Biotecnología, y desarrollados en Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, Departamento de Biología Celular e Histología.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los siguientes proyectos.

Proyectos regionales:

“Mejora de la producción de la acuicultura mediterránea mediante el uso de herramientas biotecnológicas”. Número de Proyecto: 19883/ GERM /15. Entidad financiadora: Programa de ayudas a las Unidades y Grupos de Excelencia Científica de la Región de Murcia, Fundación Séneca. Periodo: 01/01/2016-31/12/2019. Investigador Principal: García-Ayala, A.

Proyectos nacionales:

“Proyecto Mugildiet: Diseño y evaluación de dietas para una acuicultura sostenible de mugílicos” Número de Proyecto (2017/2424) Entidad Financiadora: Fundación Biodiversidad, Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Convocatoria Pleamar, Unión Europea - Fondo Europeo Marítimo y de Pesca (FEMP) “Periodo: 01/01/2018-31/01/2019. Investigador Principal: Mancera, Juan Miguel.

Publicaciones

Publicaciones relacionadas con la presente Tesis

La presente tesis constituye un trabajo original del doctorando, y constituye la principal publicación de su trabajo. Los resultados son originales y no han sido publicados previamente en revistas científicas.

Trabajos presentados a conferencias o congresos

Durante la realización de esta tesis se han realizado numerosas presentaciones de los resultados en congresos científicos, de las que aquí solo se recogen las realizadas de manera oral y directa a congresos nacionales o internacionales.

Fernández-Pérez, V., & **Vilchez-Gomez, L.** (2017, 27 septiembre). El cultivo de mugílidos en zonas de especial protección ambiental en la Península Ibérica como vía de recuperación económica de humedales y salinas. Comunicación oral. II Congreso de Biodiversidad y Conservación de la Naturaleza, Almería, España.

Vilchez-Gomez, L., Cámara-Ruiz, M., Guardiola, F., & Esteban, M. (2017, 3 octubre). Inclusión de levaduras de la industria cervecera en dietas para *Chelon labrosus* L. Comunicación oral. XVI Congreso Nacional de Acuicultura 2017, Zaragoza, España.

Vilchez-Gomez, L., Ceballos, D., Guardiola, F., González Silvera, D., Piñera, R., Calderón, J. A., Mancera, J. M., & Esteban, M. (2019, 7 mayo). Efecto de la sustitución de harina de pescado por levadura de desecho en el sistema inmunitario del *Chelon labrosus*. Comunicación oral. XVII Congreso Nacional de Acuicultura, Cartagena, España.

Vilchez-Gomez, L., Calderón, J. A., Mancera, J. M., & Esteban, M. (2018, June 21). *Design and evaluation of diets for a sustainable aquaculture of mugilidae (Mugildiet)*. Oral Presentation. VI Congreso Ibérico de Ictiología, Faro, Portugal.

El resto de comunicaciones en formato poster está disponible en el siguiente enlace:

<https://www.researchgate.net/profile/Luciano-Vilchez-Gomez>

Otras publicaciones y colaboraciones.

Conforto, E., **Vilchez-Gomez, L.**, Parrinello, D., Parisi, M. G., Esteban, M. Á., Cammarata, M., & Guardiola, F. A. (2021). Role of mucosal immune response and histopathological study in European eel (*Anguilla anguilla* L.) intraperitoneal challenged by *Vibrio anguillarum* or *Tenacibaculum soleae*. *Fish & Shellfish Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.05.011>

Difusión y transferencia de los resultados de investigación

Durante la realización de esta tesis se han impartido diferentes talleres y seminarios, destacando la organización y presentación de los resultados de investigación en la Jornada de transferencia de resultados de investigación, para empresas e investigadores del “Proyecto Mugildiet: Diseño y evaluación de dietas para una acuicultura sostenible de mugílicos” realizada en Cádiz, España. 30 de enero de 2019.

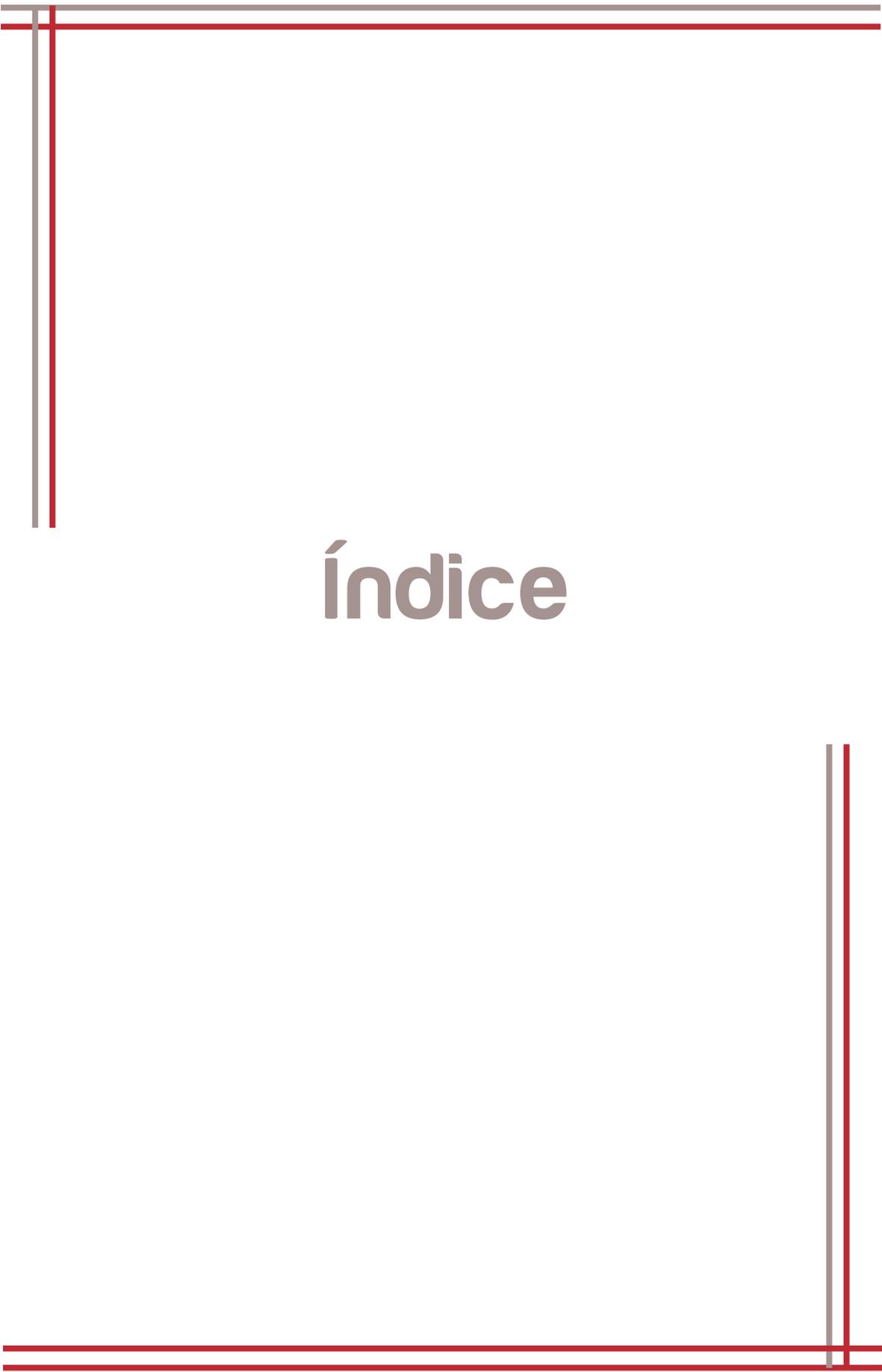
Organización de congresos

Durante el periodo doctoral se ha participado en numerosos congresos científicos, destacando la participación en el comité organizador del II Congreso de Biodiversidad y Conservación de la Naturaleza, 27, 28, 29 y 30 de septiembre de 2017. Almería, España.

Destaca sobre todo la organización y dirección por primera vez en la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, del III Congreso de Biodiversidad y Conservación de la Naturaleza, 27, 28 y 29 de septiembre de 2018. Murcia, España.

Premios

El doctorando fue finalista en la primera edición de los Fishtech Awards celebrados el 8 de noviembre de 2018 en la feria de Pesca y Acuicultura de Qingdao (China)



Índice

Lista de abreviaturas

Listas de figuras

Lista de tablas

Resumen **1**

I. Introducción **10**

I.1 La definición y origen de la acuicultura 5

I.2 Las tipologías y características de la acuicultura 10

I.3 Los costes económicos y ambientales de la acuicultura 11

I.4 El uso global de recursos por la acuicultura 12

I.5 La trampa de la harina de pescado 13

I.6 La cadena de valor de los piensos de acuicultura 16

I.7 El precio de los cultivos 17

I.8 Limitaciones al presente trabajo 18

I.9 Bibliografía 19

II. Objetivos **27**

Sección primera: Materiales y métodos **29**

Capítulo I. Materiales y métodos 1

I.1 Autorizaciones administrativas 30

I.2 Reemplazo, reducción y refinamiento en el uso de animales de experimentación 31

I.3 Animales 35

I.4 Ensayos experimentales 36

I.5 Dietas 37

I.6 Parámetros biométricos y de eficiencia de la alimentación 38

I.7 Toma de muestras 39

I.8 Parámetros de la inmunidad humoral 41

I.8.1 Actividad enzimática en el suero y en el moco de la piel 41

I.8.1.1 Actividad antiproteasa 41

I.8.1.2 Actividad peroxidasa	42
I.8.1.3 Actividad de la lisozima	43
I.8.1.4 Cuantificación de proteínas	43
I.9 Parámetros de la inmunidad celular	44
I.9.1 Actividad peroxidasa de los leucocitos de riñón cefálico	44
I.9.2 Explosión respiratoria de los leucocitos de riñón cefálico	44
I.9.3 Actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico	45
I.10 Análisis de la expresión génica	46
I.11 Otras técnicas y consideraciones	48
I.12 Análisis estadístico	48
I.13 Bibliografía	49
Capítulo II. Materiales y métodos 2. Formulación, fabricación, selección y composición de los piensos experimentales	53
II.1 Diseño y formulación de las dietas experimentales	54
II.2 Fabricación de las dietas experimentales	55
II.2.1 Tamizado, filtrado y molienda de las materias primas	55
II.2.2 Pesado de las materias primas	56
II.2.3 Mezclado y peletizado de las dietas	56
II.2.4 Secado de las dietas y pasteurizado	57
II.2.5 Adición de aditivos: antioxidantes, vitaminas o minerales, etc.	58
II.2.6 Comprobación de la calidad de los gránulos	58
II.2.7 Conservación y manipulación de las dietas	60
II.3 Resultado de la fabricación de las dietas experimentales	62
II.4 Factores limitantes en la selección de materias primas	63
II.4.1 Factores limitantes de primer nivel	64
II.4.2 Factores limitantes de segundo nivel	65
II.5 Relación de dietas utilizadas durante la experimentación	67
II.6 Composición de las dietas experimentales	68
II.7 Selección de las dietas industriales o comerciales	72
II.8 Experiencias previas realizadas	74
II.9 Bibliografía	75

Sección segunda: Evaluación biológica de la valorización de los subproductos de la industria cervecera en piensos para acuicultura

Capítulo III. Crecimiento de la dorada (<i>Sparus aurata</i>) bajo tasas de alimentación óptima y deficientes	81
III.1 Resumen y objetivos	82
III.2 Materiales y métodos	88
III.2.1 Peces	88
III.2.2 Dietas	88
III.2.2.1 Inclusión de la humedad en las dietas	89
III.2.3 Diseño experimental	90
III.2.4 Análisis estadístico	90
III.3 Resultados y discusión	90
III.3.1 Comportamiento, canibalismo y mortalidad	90
III.3.2 Crecimiento	90
III.3.3 La dispersión de tallas en acuicultura	97
IV. 4 Bibliografía	100
Capítulo IV. Evaluación de la respuesta inmunitaria de la dorada (<i>Sparus aurata</i>) bajo regímenes deficitarios de alimentación	105
IV.1 Resumen y objetivos	106
IV.2 Materiales y métodos	108
IV.2.1 Peces	108
IV.2.2 Dietas	109
IV.2.3 Diseño experimental	110
IV.2.4 Análisis estadístico	111
IV.3 Resultados	112
IV.3.a) Comportamiento, canibalismo y mortalidad	112
IV.3.b) Crecimiento	113
IV.3.c) Parámetros inmunitarios	114
IV. 4 Discusión	134
IV. 5 Bibliografía	139

Capítulo V. Evaluación del crecimiento y de estado inmunitario de la liseta (<i>Chelon labrosus</i>) alimentada con dietas de bajo contenido energético y proteico	145
V.1 Resumen y objetivos	146
V.2 Materiales y métodos	147
V.2.1 Peces	147
V.2.2 Dietas	147
V.2.3 Diseño experimental	149
V.2.4 Análisis estadístico	150
V.3 Resultados	151
V.3.a) Comportamiento, canibalismo y mortalidad	151
V.3.b) Crecimiento	153
V.3.c) Parámetros inmunitarios	154
V. 4 Discusión	166
V. 5 Bibliografía	167
Capítulo VI. Evaluación del crecimiento y de estado inmunitario de la liseta (<i>Chelon labrosus</i>) alimentada con dietas industriales	171
VI.1 Resumen y objetivos	172
VI.2 Materiales y métodos	173
VI.2.1 Peces	173
VI.2.2 Dietas	173
VI.2.3 Diseño experimental	174
VI.2.4 Análisis estadístico	175
VI.3 Resultados	176
VI.3.a) Comportamiento, canibalismo y mortalidad	176
VI.3.b) Crecimiento	176
VI.3.c) Parametros inmunitarios	178
VI. 4 Discusión	190
VI. 5 Bibliografía	198

Capítulo VII. Evaluación del crecimiento y del estado inmunitario de la liseta (<i>Chelon labrosus</i>) alimentada con dietas basadas en levaduras de desecho, diferentes perfiles de ácidos grasos, y mantenidas en diferentes porcentajes de salinidad (36 ‰ y 0 ‰)	201
VI.1 Resumen y objetivos	202
VI.2 Materiales y métodos	203
VI.2.1 Peces	203
VI.2.2 Dietas	204
VI.2.3 Diseño experimental	205
VI.2.4 Análisis estadístico	206
VI.3 Resultados	207
VI.3.a) Comportamiento, canibalismo y mortalidad	207
VI.3.b) Crecimiento	208
VI.3.c) Parametros inmunitarios	209
VI. 4 Discusión	220
VI. 5 Bibliografía	221

Sección tercera: Evaluación económica de la valorización de subproductos de la industria cervecera en piensos para acuicultura

Capítulo VIII. Evaluación bioeconomica de la sustitución de las harinas de pescado por otras materias primas alternativas, y de las dietas de la investigación	223
VIII.1 Objetivos	224
VIII.2 Las materias primas utilizadas en este trabajo	225
VIII.2.1 La harina de pescado	225
VIII.2.2 La calidad de la harina de pescado en los piensos	227
VIII.3 Las dietas y su conversión en biomasa de manera eficiente	229
VIII.4 La obsesión de la industria ganadera con el Factor de Conversión	231
VIII.5 La necesaria comparación de los datos biológicos obtenidos en este trabajo con otros estudios	232

VIII.6 Los precios de los piensos para la acuicultura **236**

VIII.7 Integración con los datos de producción con los precios de los piensos. Análisis de los costes de la alimentación España – Egipto para la producción piscícola de diferentes especies. Evaluado en dos escenarios: pre-COVID19 y guerra de Ucrania, y actual (a 8/2022) **237**

III. Discusión **243**

III.1 Las levaduras de desecho como materias primas en piscicultura y el estado inmunitario de los peces **243**

III.2 Las harinas de pescado su sustitución y la salud de los peces **244**

III.3 La valoración bioeconomica de las dietas **245**

IV. Conclusiones **248**

Lista de abreviaturas

<i>c3</i>	Componente 3 del complemento
<i>cox-2</i>	Ciclooxigenasa 2
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<i>hamp</i>	Hepcidina
<i>igt</i>	Inmunoglobulina T cadena pesada
<i>Il-1β</i>	Interleucina 1 β
LCA	Ánalisis del ciclo de vida
<i>lyz</i>	Lisozima
MN	Macronutrientes
mN	Micronutrientes
Mt	Millones de toneladas
PnR	Peces no infectados
PR	Peces Retados
qPCR	PCR cuantitativa
t	Tonelada
<i>tcα-β</i>	Receptor de linfocitos β
<i>tnfα</i>	Factor de necrosis tumoral α
<i>β-def</i>	β -defensina

Índice de figuras

Número	Leyenda	Página
Figura 1	Mújoles pintados en la roca. Steve Parish	7
Figura 2	Esquema de un mújol de la especie <i>Liza diadema</i> o <i>Liza dussumieri</i>	7
Figura 3	Clasificación de los tipos de acuicultura. Fundación OESA.	12
Figura 4	Uso de las harinas y aceites de pescado. 2013. (FAO, 2014)	15
Figura 5	Consumo de pescado estimado para 2025. De redes y anzuelos (Alonso & Clemente 2017)	24
Capítulo I		
Figura 6	Obtención del moco de la piel de un ejemplar de dorara (<i>Sparus aurata</i>)	45
Figura 7	Obtención de la sangre de un ejemplar de dorara (<i>Sparus aurata</i>).	46
Figura 8	Fotografía realizada a un <i>Chelon labrosus</i> para su posterior análisis informático de las medidas biométricas.	49
Figura 9	Extracción del riñón cefálico de un ejemplar de dorara (<i>Sparus aurata</i>)	49
Figura 10	A) Extracción del riñón cefálico de un ejemplar de dorara (<i>Sparus aurata</i>); B) tamizado de las células obtenidas para su posterior uso en el laboratorio y evaluación de la inmunidad celular.	50
Capítulo II		
Figura 11	Imagen de una muestra de la harina de pescado de subproductos de la industria transformadora	52

Figura 12	Fotografía de las materias primas de uno de los piensos semi-húmedos fabricados y utilizados en la experimentación, realizada durante el proceso de pesado previo al mezclado	53
Figura 13	Imagen de la matriz de extrusión múltiple (diámetro 1 mm) utilizada para la fabricación de los gránulos	54
Figura 14	Fotografía de los gránulos de uno de los piensos semi-húmedos fabricados y utilizados en la experimentación, de diámetro del gránulo entre 1 mm y 2 mm	55
Figura 15	Fotografía de los piensos secos realizados en Proyecto LIFE Brewery para la realización de las pruebas de digestibilidad en el IRTA. Compartida de manera pública en Facebook el 7/3/2019 en el perfil del proyecto.	56
Capítulo III		
Figura 16	Traducción de las tablas I y II de Austreng & Refstie, 1979	84
Figura 17	Propuesta de alternativa a las dietas experimentales de Austreng & Refstie, 1979	86
Figura 18	Evolución de las cantidades suministradas de las dietas A, B, C y D	91
Figura 19	Cantidades totales de dieta suministrada por grupo. (Grupos A, B, C y D).	92
Figura 20	Ingesta relativa (en porcentaje), Grupos A (100 %), B, C y D	93
Figura 21	Ingesta relativa (%), de los Grupos A, B, C y D, frente al Grupo A (o 100 % de ingesta nutricional)	94

Figura 22	Diagrama de dispersión de puntos de los diferentes grupos experimentales, representando la ingesta frente al crecimiento, en peso (g) y en los diferentes puntos de muestreo P1 a P6	95
------------------	--	-----------

Capítulo IV

Figura 23	Actividad peroxidasa del suero	116
Figura 24	Actividad proteasa del suero	117
Figura 25	Actividad antiproteasa del suero	118
Figura 26	Actividad peroxidasa del moco de la piel	121
Figura 27	Actividad proteasa del moco de la piel	123
Figura 28	Actividad antiproteasa del moco de la piel	124
Figura 29	Actividad lisozima del moco de la piel	125
Figura 30	Cuantificación de proteínas en el moco de la piel	126
Figura 31	Actividad peroxidasa de leucocitos del riñón cefálico	128
Figura 32	Explosión respiratoria de los leucocitos del riñón cefálico	129
Figura 33	Capacidad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico	131
Figura 34	Habilidad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico	131
Figura 35	Análisis de la expresión génica en intestino	133
Figura 36	Análisis de la expresión génica en piel	134

Capítulo IV

Figura 37	Actividad peroxidasa del suero	116
------------------	--------------------------------	------------

Figura 24	Actividad proteasa del suero	117
Figura 25	Actividad antiproteasa del suero	118
Figura 26	Actividad peroxidasa del moco de la piel	121
Figura 27	Actividad proteasa del moco de la piel	123
Figura 28	Actividad antiproteasa del moco de la piel	124
Figura 29	Actividad lisozima del moco de la piel	125
Figura 30	Cuantificación de proteínas en el moco de la piel	126
Figura 31	Actividad peroxidasa de leucocitos del riñón cefálico	128
Figura 32	Explosión respiratoria de los leucocitos del riñón cefálico	129
Figura 33	Capacidad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico	131
Figura 34	Habilidad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico	131
Capítulo V		
Figura 35	Ejemplares de A) dorada (<i>S. aurata</i>) y B) de lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>) depredados por sus congéneres de igual talla	152
Figura 36	Actividad peroxidasa del suero	155
Figura 37	Actividad proteasa del suero	156
Figura 38	Actividad antiproteasa del suero	157
Figura 39	Actividad lisozima del suero	158
Figura 40	Actividad peroxidasa del moco de la piel	159
Figura 41	Actividad proteasa del moco de la piel	160

Figura 42	Actividad antiproteasa del moco de la piel	161
Figura 43	Actividad lisozima del moco de la piel	162
Figura 44	Cuantificación de proteínas en el moco de la piel	163
Figura 45	Capacidad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico	165
Figura 46	Habilidad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico	165
Capítulo VI		
Figura 47	Pesos iniciales frente a los pesos finales de los ejemplares de <i>C. labrosus</i> alimentados durante 78 días con las Dietas A y B	177
Figura 48	Actividad peroxidasa del suero	179
Figura 49	Actividad proteasa del suero	180
Figura 50	Actividad antiproteasa del suero	181
Figura 51	Actividad lisozima del suero	182
Figura 52	Actividad peroxidasa del moco de la piel	183
Figura 53	Actividad proteasa del moco de la piel	184
Figura 54	Actividad lisozima del moco de la piel	185
Figura 55	Cuantificación de proteínas en el moco de la piel	186
Figura 56	Actividad peroxidasa de leucocitos del riñón cefálico	188
Figura 57	Capacidad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico	189
Figura 58	Habilidad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico	190

Capítulo VII

Figura 59	Actividad peroxidasa del suero	210
Figura 60	Actividad proteasa del suero	211
Figura 61	Actividad lisozima del suero	212
Figura 62	Actividad peroxidasa del moco de la piel	213
Figura 63	Actividad proteasa del moco de la piel	214
Figura 64	Actividad lisozima del moco de la piel	215
Figura 65	Cuantificación de proteínas en el moco de la piel	216
Figura 66	Capacidad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico	218
Figura 67	Habilidad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico	218

Capítulo VIII

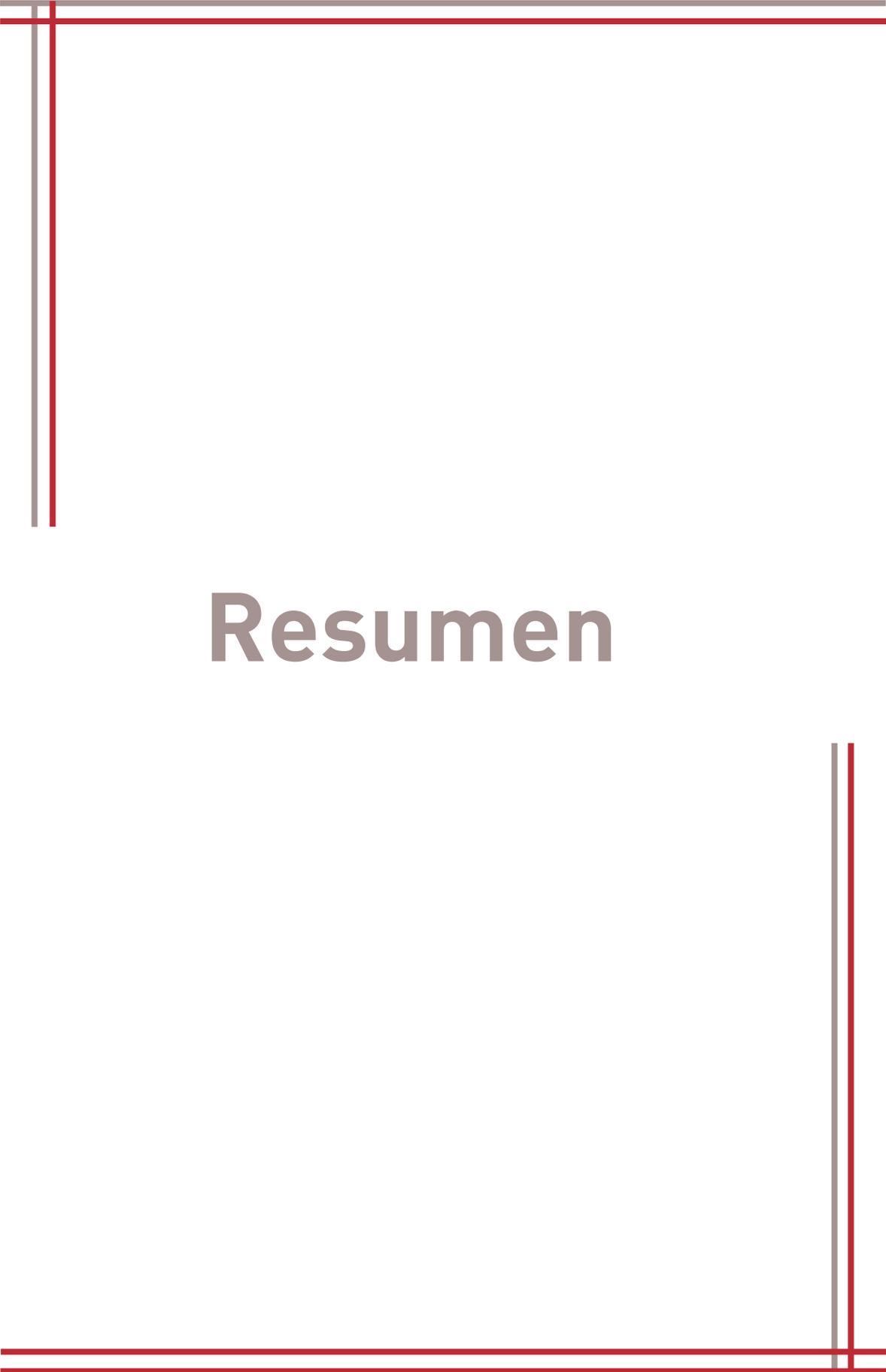
Figura 68	Índices de Conversión del Alimento para diferentes especies ganaderas. Adaptado de Fry <i>et al.</i> , 2018	231
------------------	---	------------

Adaptada de Fry *et al.*, 2018 (Tabla 1, y de la tabla S5 de los materiales complementarios)

Índice de tablas

Número	Leyenda	Página
	Capítulo I	
Tabla 1	Números de acceso de genes y secuencias de cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica	47
	Capítulo II	
Tabla 2	Relación de dietas utilizadas durante la experimentación	67
Tabla 3	Formulación y composición (%) de las dietas experimentales	68
Tabla 4	Composición proximal (%) de las dietas experimentales e industriales	69
Tabla 5	Composición de ácidos grasos de algunas de las materias primas utilizadas	71
Tabla 6	Composición de ácidos grasos de algunas de las dietas utilizadas	71
	Capítulo III	
Tabla 7	Índices de conversión del alimento normal y corregido	96
	Capítulo IV	
Tabla 8	Índices de crecimiento y aprovechamiento del alimento durante el periodo experimental	113
Tabla 9	Índices de conversión del alimento normal y corregido	113
	Capítulo V	
Tabla 10	Composición en ácidos grasos resumida	148

Tabla 11	Índices de crecimiento y aprovechamiento del alimento durante el periodo experimental	153
	Capítulo VI	
Tabla 12	Índices de crecimiento y aprovechamiento del alimento durante el periodo experimental	176
	Capítulo VII	
Tabla 13	Composición en ácidos grasos resumida	204
Tabla 14	Índices de crecimiento y aprovechamiento del alimento durante el periodo experimental	208
Tabla 15	Análisis realizados por la Universidad de Cádiz	225
Tabla 16	Análisis del coste de la alimentación de producir tilapia y similares o dorada en España o Egipto (2019, pre COVID) y ahora (8/2022)	238



Resumen

La presente tesis está enfocada en aportar nuevas soluciones en el campo de la alimentación en acuicultura sin dejar de un lado la importancia que tiene realizar desde la ciencia económica una valoración de dichas soluciones respecto a su eficiencia o viabilidad.

Esta investigación se ha llevado a cabo de manera multidisciplinaria entre la economía y la biología. Junto con la investigación biológica se ha afrontado una necesaria revisión del concepto de sostenibilidad aplicado a la producción de alimentos para la acuicultura además de abordarse determinados aspectos económicos de la producción acuícola, —sin pretender ser una revisión exhaustiva del sector— se ha puesto énfasis en aquellos aspectos que se consideran limitantes para su crecimiento a futuro.

Por un lado, la acuicultura como todas las producciones ganaderas es una actividad intensiva en el consumo de recursos naturales y energéticos. Si bien dentro de todos los tipos de ganadería que realizamos la acuicultura es quizás considerada la más eficiente, aunque de los costes de producción más de un 50 % corresponde al alimento y casi otro 20 % a la compra o producción de los alevines necesarios para su engorde.

Por otro lado, la producción de cerveza es una actividad económica global con un volumen de producción a nivel mundial cada vez mayor, que tiene una faceta oculta por la enorme cantidad de desechos (levaduras, bagazos, o aguas residuales, etc.) que se producen durante el proceso de su fabricación. Tan solo en Europa se estiman que suponen entre ocho y nueve millones de toneladas anuales lo que conlleva un alto coste de gestión, eliminación y tratamiento para la industria, además de suponer un enorme desperdicio. Y porque no decirlo un grave problema ambiental cuando su gestión no se realiza responsablemente.

Actualmente estos residuos son principalmente valorizados en alimentación animal de rumiantes, y a veces en menor medida por otras industrias o sectores como para la producción de abonos orgánicos o energía. Su inclusión en piensos para acuicultura —y para diferentes especies— con anterioridad a este trabajo, pero hasta la fecha no se había logrado incluir estas materias primas en cantidades significativas en los piensos, ni con unos resultados prometedores. Estos subproductos principalmente bagazos, y levaduras de desecho son producidos en cantidades suficientes como para que su uso en acuicultura sea viable, y tienen unos costes de partida razonables para intentar evaluar su uso como materias primas principales en piensos compuestos para el sector. Si bien, su alto grado de humedad (alrededor del 80 – 85 %) de su peso ha limitado su uso tanto experimental como industrial, y supone una limitación a su uso como materias primas.

La validación de estas nuevas fuentes principalmente proteicas, en piensos para las especies sobre las que se ha llevado esta investigación — la liseta o albur (*Chelon labrosus*) o la dorada (*Sparus aurata*)— se ha llevado a cabo partiendo de una evaluación económica de las alternativas escogidas durante los diseños experimentales y la fabricación de los experimentos.

Además de la **Introducción** y los **Objetivos** propuestos, este texto se divide en tres secciones, una **Sección primera: Materiales y métodos**, donde se recogen las actividades y técnicas utilizadas para la evaluación biológica, así como todo lo relativo a la selección de las dietas industriales y la fabricación de las dietas experimentales; una **Sección segunda: Evaluación biológica de la valorización de subproductos de la industria cervecera en piensos para acuicultura** dónde se recogen los experimentos realizados y la valoración biológica de las dietas. Y una **Sección tercera: Evaluación económica de la valorización de subproductos de la industria cervecera en piensos para acuicultura** donde se analiza la sostenibilidad económica de estas posibles soluciones.

En la **Sección segunda** se recogen los cinco experimentos biológicos realizados, tanto con dorada como con liseta, en los que se aportan a los peces diferentes dietas tanto industriales como fabricadas expreso con subproductos de la industria cervecera y de la industria conservera hasta un 89 % de su composición.

En la **Sección tercera** la revisión del concepto de sostenibilidad en acuicultura y el análisis bioeconómico de los piensos probados en la **Sección segunda**.

Aunque cada capítulo recoge sus datos, y la discusión sobre los resultados obtenidos, se recoge a modo de recopilación una **Discusión general** completa de la experimentación realizada durante el periodo pre-doctoral y doctoral. Finalmente se recogen unas también necesarias **Conclusiones** sobre el cumplimiento de los objetivos del presente trabajo.

Cada capítulo lleva su bibliografía, para facilitar la lectura de manera independiente.. Para la confección de la misma se ha optado por utilizar las normas de “*American Psychological Association 7th edition*”.

NOTAS: Cada capítulo de este trabajo lleva en su primera página una lámina de una especie diferente de las tradicionalmente cultivadas en la acuicultura mediterránea, junto con un código QR que facilitará al lector el acceso a un repositorio en abierto de datos de importancia e interés sobre la especie. Así como el acceso a bibliografía complementaria.



I. Introducción

I.1 La definición y origen de la acuicultura

En 1988, la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) definió la acuicultura (FAO, 1988) para reducir la confusión existente con las pesquerías:

Aquaculture is the farming of aquatic organisms, including fish, molluscs, crustaceans and aquatic plants. Farming implies some form of intervention in the rearing process to enhance production, such as regular stocking, feeding, protection from predators, etc. Farming also implies individual or corporate ownership of the stock being cultivated. For statistical purposes, aquatic organisms which are harvested by an individual or corporate body which has owned them throughout their rearing period contribute to aquaculture, while aquatic organisms which are exploitable by the public as a common property resources, with or without appropriate licences, are the harvest of fisheries.

Traducción: «La acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos, incluidos peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas. La acuicultura implica alguna forma de intervención en el proceso de crianza para mejorar la producción, como la estabulación regular, la alimentación, la protección contra los depredadores, etc. La acuicultura también implica la propiedad individual o corporativa de la población que se cultiva. Para fines estadísticos, los organismos acuáticos que son cosechados por un individuo o entidad corporativa que los ha poseído durante su período de crianza contribuyen a la acuicultura, mientras que los organismos acuáticos que son explotados por el público como recursos de propiedad común, con o sin licencias apropiadas, son las cosechas de la pesca»

Si atendemos a la definición anterior el mayor hito lo encontramos en establecer el derecho de propiedad sobre los cultivos, característica esta que claramente diferencia a la acuicultura de la pesca (y que fue establecida al menos en tiempos de la República Romana). Si atendemos a la definición que realiza la Real Academia Española, 2019 el significado de acuicultura como rama del conocimiento su definición no se circunscribe al concepto del cultivo de organismos acuáticos —y su propiedad— ya que engloba también el conjunto de técnicas y conocimientos necesarios para realizar la crianza de las especies acuáticas.

Dentro de las características de la acuicultura y sin que pretendamos hacer una enumeración exhaustiva de ellas, —y por diferenciarla de la pesca— como modos por los que obtenemos nuestro alimento del mar (y de los ríos). No solo la propiedad establecida por los romanos (Fernández Pérez, 2002; Marzano, 2013b) es un factor que las diferencia, sino que también implica que se elimina la aleatoriedad, azar y estacionalidad de la pesca, y el acuicultor mantiene unas poblaciones de animales bajo control que le permite seleccionar el mejor momento para venderlas en el mercado.

Así el objetivo de la acuicultura, y del acuicultor no es solo producir alimento, y producir un alimento de calidad, sino que también existe un innegable componente comercial y de obtener beneficios con su actividad empresarial.

La acuicultura surge de la observación de la naturaleza, los ciclos vitales y migraciones de los peces entre el mar y los estuarios, y cuando el hombre empieza a estabular ejemplares salvajes en rudimentarias trampas de piedra y madera, para mantener cautivos estos animales y para poder aprovecharse de ellos en el momento en que realmente los necesite realmente como alimento evitando el deterioro rápido del pescado una vez que se pesca. Ya que no es hasta un momento mucho posterior con la fabricación de las salazones y en un momento aún mucho más cercano a nuestros días con la aparición del frío comercial cuando hemos conseguido conservar nuestros alimentos.

La acuicultura, tiene un origen común datado en el neolítico alrededor del 6.000 a.C. en la antigua China con la acuariología o la acuariofilia, fecha aproximada en la que se data la producción de carpas con fines ornamentales y para servir como alimento (Costa-Pierce, 2022; Nakajima et al., 2019). Pero al igual que sucede con la agricultura, u otras ganaderías que no las ha inventado nadie, y surgen en todo el mundo de manera similar para cubrir las necesidades de alimento de los primeros pobladores, estamos seguros que la acuicultura surge mucho antes de los registros arqueológicos que conservamos. Los registros arqueológicos más antiguos que hemos encontrado que relacionen los mújoles con los humanos es a través de pinturas rupestres, las cuales se hayan localizadas en el parque natural de Kakadu (Australia) y tienen aproximadamente unos 40.000 años. Figura 1 y 2 (reproducidas con permiso de los autores, licencia para fines educativos y divulgativos) siendo además de un excelente registro sobre esta relación del hombre con los mújoles, y sobre todo un tratado en piedra sobre anatomía animal (P. S. C. Tacon, 1989).

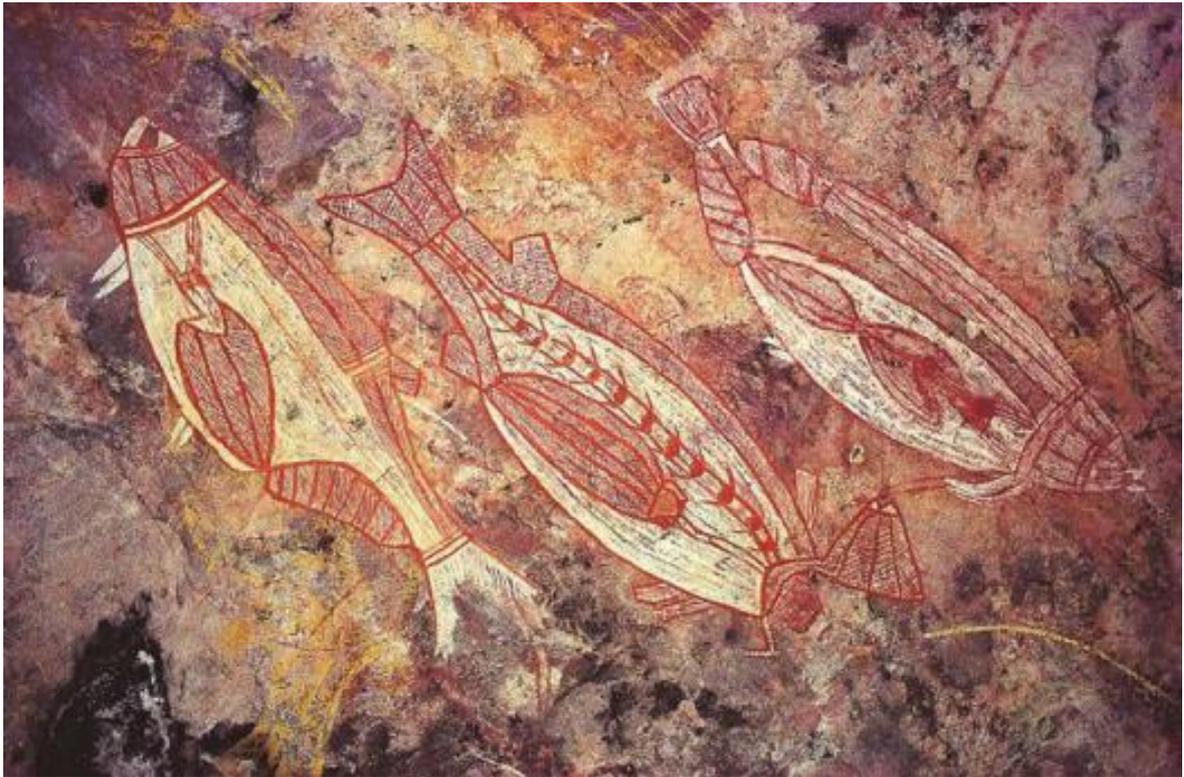


Figura 1: Mújoles pintados en la roca, ubicados en el Parque Nacional de Kakadu (Australia). Datados aproximadamente 40.000 a.C. Ejemplo de arte primitivo esquemático como si fuera una radiografía de los animales. Derechos cedidos por Nature Connect Pty. Ltd. (Australia) Fotógrafo Steve Parish.

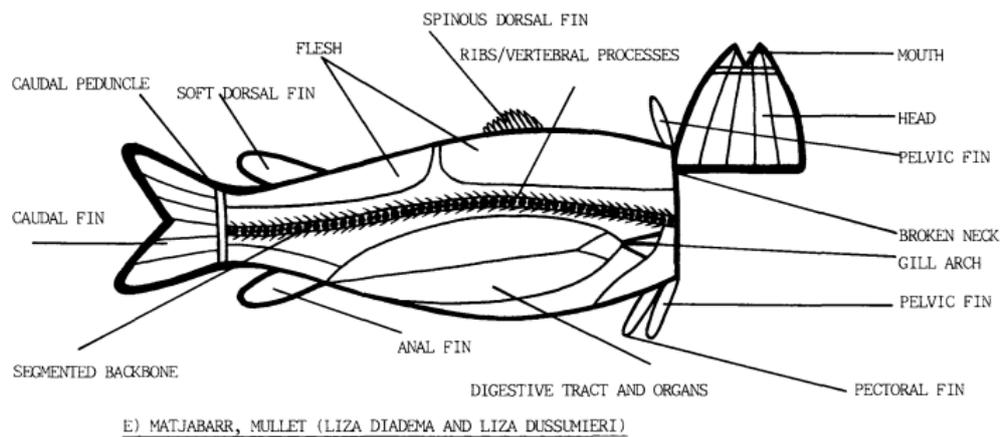


Figura 2: Esquema de un mújol de la especie *Liza diadema* o *Liza dussumieri* extraído de la tesis doctoral de D. Paul Tacon. Esquema de un dibujo de arte rupestre ubicado en el Parque Nacional Kakady (Australia). Derechos cedidos por el autor. (Tacon, 1989)

Es evidente que el consumo de peces y mariscos se lleva realizando por miles de años, y que estos son un recurso sencillo de capturar en estuarios, charcas intermareales, pozas de ríos, etc., pero es bastante más difícil que esos registros nos lleguen intactos o en buen estado de conservación —como sucede en el caso de Kakadu—, y mucho más difícil que incluyan interesantes rasgos de la anatomía y fisionomía de esas especies, demostrando el conocimiento sobre la biología de determinadas especies que ya se tenía en las comunidades primitivas. No es, por tanto, ilógico pensar, que este conocimiento sobre su biología fue utilizado posteriormente para realizar su domesticación y su cultivo, y tampoco lo es pensar que en otras partes del mundo se hubiera adquirido del mismo modo por observación idénticos conocimientos, y que esto fuera, como creemos, la piedra angular que luego permitió su cultivo —de manera similar, a lo largo y ancho del mundo—. Y junto con el nacimiento de la acuicultura surge la necesidad de domesticación entendida como la habituación al cautiverio de los ejemplares obtenidos del medio natural, o la necesidad de alimentar a estos animales, el tratamiento de enfermedades y patologías; o el mantenimiento de la calidad del agua; y por supuesto el bienestar de los cultivos.

Históricamente el primer tratado escrito sobre acuicultura del que tenemos referencia versa sobre la acuicultura continental de las carpas y fue redactado en China por Fan Li (475 a.C.) aunque no es un libro de fácil acceso ([OESA, 2016](#); [Youwei & Xinming, 1986](#)), este primer y breve tratado de acuicultura es un manual económico sobre cuantas carpas sembrar y cuantos peces se van a cosechar, y su rentabilidad para el acuicultor, sin que se recojan observaciones sobre la biología de las especies, salvo que los peces se irán reproduciendo hasta llenar el estanque.

Y no es hasta unos siglos después que podemos encontrar el primer manual completo sobre el cultivo de los peces y moluscos. El primer texto sobre la acuicultura marina redactado por el gaditano Lucius Junius Moderatus Columella de sobrenombre Columella (4 d.C. – 70 d.C) quien recoge con detalle en su libro “De re rustica” (Los trabajos en el campo) Libro VIII, capítulo XVI y XVII todos los aspectos del cultivo de los peces marinos, cuales son los sitios y las especies que se pueden cultivar « el principio de esta es empresa examinar la naturaleza del lugar donde se hubiere determinado hacer las piscinas, pues no se pueden tener todas las especies de pescados en todas las costas.», como se construyen los estanques para su estabulación, o la alimentación que se les daba dependiendo del tipo de pez, e incluso dependiendo de su estado de salud ([Columella et al., 1954](#)).

Así los piscicultores romanos según Columella, alimentaban los cultivos con pescado fresco y salazones, fruta como los higos y los madroños, o incluso queso fresco o bolas de pan. En la actualidad, en China, aún se sigue alimentando los peces, con vegetales tan diversos como los restos de molindas de granos del arroz, o con habas secas. Pero como Columella recoge con detalle, la preferencia de los peces por alimentarse de otros peces (más pequeños) frescos o salados es mayor que por la de otros alimentos. En este mismo sentido ya Marcus Terrentius Varro, más conocido como Varrón (116 a.C. – 27 a.C.) ya había recogido en su obra «De Agricultura» (Varrón & Cubero Salmerón, 2010) como «Hortensio tenía un tropel de pescadores se dedica a la pesca de peces pequeños para nutrir a los grandes».

En la actualidad esta voracidad y preferencia de los peces por alimentarse de otros peces (ictiófagos: Del gr. ἰχθυοφάγος *ichthyophágos*) —que ya conocían los romanos y griegos— es su mayor limitación para incrementar las cantidades de peces que se cultivan a día de hoy. Este problema conocido como la «Trampa de la harina de pescado» que consiste en la utilización de peces de pesquerías pelágicas (como la anchoveta peruana) de escaso valor, para producir otros peces, de mayor valor como los salmónidos, o en la acuicultura mediterránea como la dorada, o la lubina.

De entre otros textos que nos han llegado son notables los textos de Aristóteles en el siglo IV a.C., Estrabón, Plinio Gayo Segundo o Plinio el Viejo, Marcial, Apuleyo, o Opiano de Anazarba, o Eliano y en concreto respecto a la acuicultura los de Marco Terencio Varrón (116 a.C. – 27 a.C.) y Columella (4 d.C. -70 d.C.). En estos textos existen numerosas descripciones de los animales marinos, sus comportamientos y biología, así como de su explotación biológica y económica mediante la pesca o la acuicultura. Y aunque existen notables diferencias tecnológicas entre cómo se realizaba la acuicultura en la antigua roma, y hoy en día, estos primeros acuicultores cubrían las necesidades nutricionales de los animales dependiendo de su especie, o realizaban el transporte en barcos piscifactoría. Algunos de los factores que describen en sus textos, desde su crianza, estabulación, hasta su venta, o su precio han variado poco en estos 2000 años.

1.2 Las tipologías y características de la acuicultura

Para poder abordar de manera resumida los factores que nos interesan resaltar respecto al control de los cultivos que se hace por parte del acuicultor, es necesario inicialmente al menos distinguir a groso modo entre los tipos de acuicultura que existen. Sirva la siguiente Figura 3 como esquema muy simplificado para resumir esta clasificación de las tipologías de la acuicultura existentes entre las especies, —ya que en el mundo se cultivan alrededor de seiscientos especies distintas— en diferentes ambientes, o sistemas y con muy diverso grado de desarrollo tecnológico.

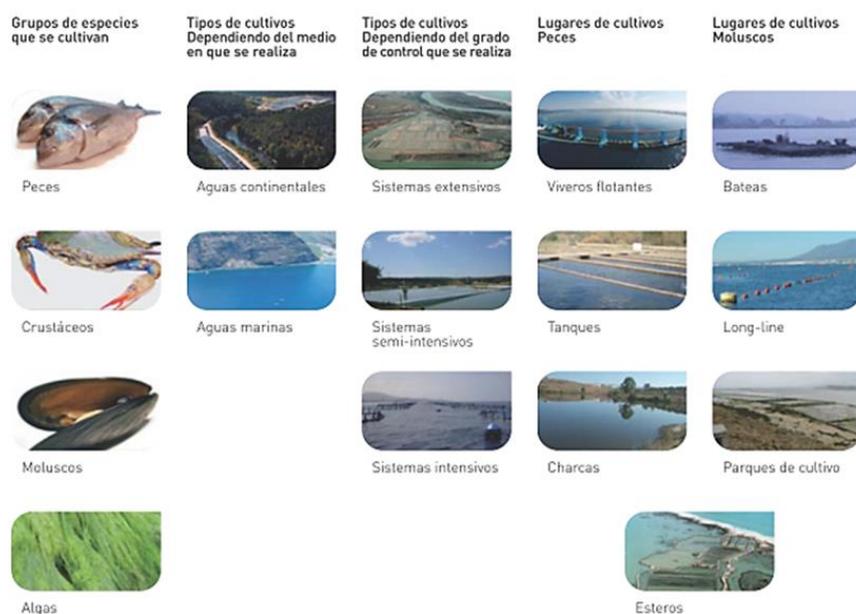


Figura 3: Clasificación de los tipos de acuicultura. Fundación OESA.

Y es que si existe una palabra que pueda describir la acuicultura como actividad esta sería diversa (Clawson et al., 2022; Metian et al., 2020). Diversa en ambientes, desde su realización en aguas continentales, marinas o aguas hipersalinas. Diversa en las especies, desde microalgas y zooplancton, hasta grandes depredadores como el atún rojo, abarcando especies de todos los eslabones de la red trófica desde productores primarios a grandes carnívoros. Y mucho más diversa si atendemos a los grados de intensificación (sistemas extensivos, intensivos, etc.) y las posibles tecnologías de cultivo, que van desde un parque de cultivo en la zona intermareal para la siembra de moluscos donde el control es mínimo hasta los ultra-tecnológicos sistemas de recirculación en acuicultura, tanto para peces como para el cultivo de microalgas.

1.3 Los costes económicos y ambientales de la acuicultura

Si buscamos los denominadores comunes de todos estos sistemas y categorías —que posteriormente nos hará falta poder evaluar su sostenibilidad— el primero lo podemos encontrar en la necesidad por parte del acuicultor de aportar los nutrientes necesarios a los cultivos, al igual que viene sucediendo por más de 2000 años. El segundo denominador común es la necesidad de «semillas» o alevines, o reproductores estabulados que permitan iniciar los cultivos.

Ambos, entre el alimento y los alevines en el caso de los peces son los factores con más peso dentro de la producción piscícola, y pueden llegar a suponer un más de un 70 % del total de los costes de producción (Barazi-Yeroulanos, 2010). Además de suponer los principales costes de producción sobre ellos recae también más del 70 % del total de los impactos ambientales de la producción analizada mediante metodologías de análisis del ciclo de vida o LCA (Henriksson et al., 2013; Pelletier et al., 2009, 2011).

La sostenibilidad por el uso intensivo de recursos por parte de la piscicultura es a veces es controvertida (Ayer et al., 2009; Campanati et al., 2022; Hansen, 2019). Y sin duda uno los aspectos más controvertidos al hablar de la producción acuícola y su sostenibilidad es el cultivo de especies carnívoras (como el salmón o la dorada, etc.), y su gran dependencia de las harinas y aceites de pescado como materias primas para los piensos (Costello et al., 2020; Cottrell et al., 2020, 2021; Naylor et al., 2000), o la necesidad de comparación de su eficiencia con otras ganaderías (Fry et al., 2018). Aunque la industria ha realizado un gran esfuerzo en reducir el consumo de estas materias primas todavía supone un gran porcentaje de las dietas de determinadas especies, así por ejemplo en España entre el 25 y el 30 % de los ingredientes siguen teniendo su origen en ingredientes marinos (Aprumar, 2021). Otro tanto igual, o más se incorpora para las dietas del salmón atlántico (Aas et al., 2019, 2022).

Respecto a la sostenibilidad de las prácticas que ya realizaban los romanos de la captura de alevines salvajes para su engorde, quizás sea uno de los mayores impactos de la acuicultura en el medio ambiente y también uno de los menos evaluados. El tipo de acuicultura basada en la captura de alevines “*capture-based aquaculture*” se realiza por un simple balance económico, ya que su coste de captura es menor que el de cultivo. Pero en estas estimaciones no se está teniendo en cuenta el coste ambiental de la retirada de millones

de alevines de la cadena trófica marina, que podía ser comparable al uso de harinas de reducción de pesquerías pelágicas, cuando son especies que se ha conseguido su reproducción en cautividad (Crosetti & Blaber, 2016; Lovatelli et al., 2008; Shaalan et al., 2018) siendo necesario revisar cómo se realiza esta acuicultura, ya que las ventajas de la cría en cautividad y selección de los alevines que se produce por la domesticación de las especies (Teletchea & Fontaine, 2014).

1.4 El uso global de recursos por la acuicultura

Aunque hay una tendencia a pensar que las especies de peces que cultivamos son herbívoros por los altos niveles de inclusión en los piensos de materias primas vegetales, y que esto entre comillas modifica su nivel trófico y los hace más sostenibles (Cottrell et al., 2021), el uso global de recursos marinos o terrestres (independientemente de su origen siendo elevado), y difícilmente se puede reducir sin cambiar el paradigma de que cultivar especies de alto valor comercial (carnívoras) para la exportación es más rentable que cultivar especies de menor valor comercial (herbívoras u omnívoras) pero que suponen una fuente importante de alimento en los países menos desarrollados.

Si por un lado analizamos las estadísticas publicadas para la producción del año 2018 disponibles gracias al trabajo realizado por La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura —en adelante FAO, ya que es más conocida por sus siglas en inglés—. Podemos comprobar como las especies más producidas (datos para 2018) a nivel mundial por la acuicultura año tras año son las carpas, barbos y otros ciprínidos, aproximadamente 30,6 Mt (millones de toneladas), las tilapias (6,1 Mt), los peces gato (6 Mt), las algas macro algas rojas (18,1 Mt), y marrones (16,8 Mt), gambas y camarones (crustáceos) (7 Mt). Los salmónidos y truchas suponen una producción de 4 Mt. (FAO, 2022b). En total, la producción global excluidas las algas y organismos filtradores, etc. que no necesitan de alimento en forma de piensos compuestos, (datos para 2018) sería aproximadamente de 87,5 Mt que es la producción de animales acuáticos, de un global de 122,6 Mt con un valor de 281.500 millones de dólares, de las que y 35,1 Mt son la producción de algas. Datos que aun siendo ascendentes aproximadamente entre un 3 o 4 % anual ya se pueden considerar más o menos estables para cada año. Sin que sean esperables saltos en la producción drásticos. Por lo que la acuicultura y desde 2013 suministra a los hogares más o menos la misma cantidad de alimento que las pesquerías. (FAO, 2014, 2020b, 2022a, 2022b)

Si por otro lado analizamos las estadísticas de pienso o alimento producido para la acuicultura globalmente (Alltech, 2022) y que es publicado cada año por el gigante de la alimentación animal Alltech, para 2020 se produjeron un total de 49,5 Mt de los que Asia encabeza la producción con 36,43 Mt.

Si cruzamos estos datos, esto supone un consumo de pienso aparente por kilo de animales acuáticos (peces más crustáceos) de 0,77 kg pienso/kg pez (datos calculados en este trabajo y que se muestran en la sección económica). Estos cálculos no incluyen otros aportes de alimento como puede ser el alimento vivo producido para los alevines, pescado troceado o piensos hechos en la granja, hechos con subproductos como hacía Columella, salvados de arroz, restos de alimentos, etc.

1.5 La trampa de la harina de pescado

Para producir este total de 49,5 Mt de pienso que anualmente consume la acuicultura se consume una cantidad indeterminada de recursos pesqueros (Péron et al., 2010), y los datos disponibles y los ratios de conversión de las pesquerías pelágicas de escaso valor en harinas y aceites de pescado a nivel global varía según se hagan con unas especies y otra dependiendo de la composición del pescado utilizado, y también por la huella oculta o los datos mal comunicados de determinados países a las estadísticas pesqueras de la FAO.

Es difícil determinar cuánto es el pescado de reducción realmente consumido a nivel global al año y más difícil determinar cuánto es la proporción que consume la acuicultura. Y los trabajos científicos que han tenido relevancia en este aspecto tiene una media de entre 15 y 20 años (New & Wijkström, 2002; Péron et al., 2010; A. G. J. Tacon et al., 2009; A. G. J. Tacon & Metian, 2009). En parte quizás por el esfuerzo realizado por la industria en la reducción de estas materias primas. La suma del uso preferente de subproductos de la pesca y la acuicultura (que se estima en un 25 – 35 %) del consumo total de harinas y aceites de pescado (FAO, 2020b), la gran inclusión de materias vegetales en los piensos incluso de las especies carnívoras (Aas et al., 2019, 2022), y la intensidad en densidad de las dietas gracias a las tecnologías de extrusión y de inclusión de aceites por bombas de vacío (“*vaccum coating*”), o la dificultad de hacer estadísticas globales parece que hace la ciencia haya perdido interés en saber cuántos son los recursos pesqueros que la acuicultura, y otras ganaderías consumen cada año.

La suma de estas innovaciones ha hecho que el alimento para peces haya pasado en 60 años de prácticamente ser poco más que peces triturados, ligeramente procesados y hervidos, con la adición de algún aglutinante, a verdaderas obras de ingeniería biológica con formulaciones milimétricas donde a demanda de las especies, su talla y las condiciones de cultivo se van ajustando los niveles de macronutrientes (MN) y micronutrientes (mN) (Halver & Ashley, 1972; National Research Council, 1981, 1992). Y aunque en los últimos años la presión hacia la industria es menor por parte del consumidor, lo cierto es que de un tiempo a esta parte no se consigue reducir para determinadas especies el consumo de pienso, y las ratios de conversión se hayan prácticamente estancados. Ni el consumo de materias primas —como las harinas y aceites de pescado en principio insostenibles— se ha reducido, y su demanda, consumo global y precio son mayores año tras año.

Desde hace años, los cupos de capturas pesqueras están también estancados, cada vez pescamos más lejos y más profundo, pero no aumentamos el volumen anual de capturas pesqueras y los bancos pesqueros tradicionales como el Mediterráneo cada vez acusan más la presión de las flotas declaradas o ilegales. Nos es difícil pescar anualmente más de 90 Mt, y la situación de algunos caladeros como el Mediterráneo es más que preocupante. Así parece que nuestra necesidad de cultivar los mares viene precedida de una mala gestión de los recursos pesqueros, y una sobreexplotación de las especies objetivo que ya conocían los romanos (Bernal et al., 2020; Boonstra & Österblom, 2014; Cao et al., 2015; Eriksson et al., 2015; Haberl et al., 2007; Kroodsma et al., 2018).

Fue, durante la dominación romana del Mediterráneo, cuando se comenzó a evidenciar la sensibilidad de los recursos pesqueros a la sobreexplotación. Y Juvenal (S.I. d.C.) (Juvenal, 2008) (Juvenal, *Sátiras*, V, 92) recogía que «Del dueño será el mújol de Córcega o de los escollos de Tauromenio (Taormina, Sicilia), pues nuestro mar está todo esquilmo y ya no da abasto, mientras la glotonería se enardece al tiempo que el mercado rebusca una y otra vez con redes en las proximidades y no dejamos crecer los peces del Tirreno.», y por ello se empezó a regular su aprovechamiento siendo conocidas leyes romanas sobre la pesca, los artes de pesqueros, o la acuicultura. Textos legales destinados a conservar los recursos naturales u organizar su aprovechamiento o leyes destinadas a gravar con impuestos estas actividades (Fernández Pérez, 2002). Sirva esta anécdota para evidenciar que nuestros impactos ecológicos han cambiado poco durante los años (Hughes, 2014). Y lo ligada que está la acuicultura a la sobreexplotación de los recursos pesquero.

Aproximadamente cada año, pescamos unos 24 Mt de peces de especies pelágicas de escaso valor para su reducción en harinas y aceites de pescado. (European Commission. Directorate General for Maritime Affairs and Fisheries. & EUMOFA., 2021b, 2021a; FAO, 2014, 2020a) Y no solo, para que los datos de las estadísticas mundiales reflejen que la acuicultura ya produce —desde el 2.013— más toneladas de alimento que la pesca, pero que obvian la pesca ilegal, no declarada, y no reglamentada (INDNR), o en inglés (*Illegal, Unreported and Unregulated fishing, IUU*) que se ha estimado al menos en un 30 % de todas las capturas legales pesqueras. Y que obvian en cierta medida que más de un 25 % de las capturas legales se utilicen para la fabricación de harinas o aceites de pescado, y eso sin tener en cuenta que no se sabe la cantidad de las capturas IUU que son utilizadas para esto último. O las cantidades que son descartadas por la borda de los barcos por no ser especies «objetivo» y que son consideradas descartes, o las cantidades de estos descartes que se usan para hacer harina de pescado.

Por eso trabajos como el realizado por Péron et al., 2010 no son utilizables para establecer cuál es la ratio de conversión de las pesquerías pelágicas en harina de pescado, pero si supone una clara exposición de un problema que arroja más sombras que luces sobre el desarrollo y éxito de la acuicultura, de otras ganaderías, ya que —y obviando expresamente la cita hay formulaciones de pienso para pollos con más de un 20 % de harinas de pescado—. Podemos comprobar en los últimos datos publicados por la FAO, como un 5 % de la harina y aceite de pescado se utiliza en ganadería y un Figura 4.

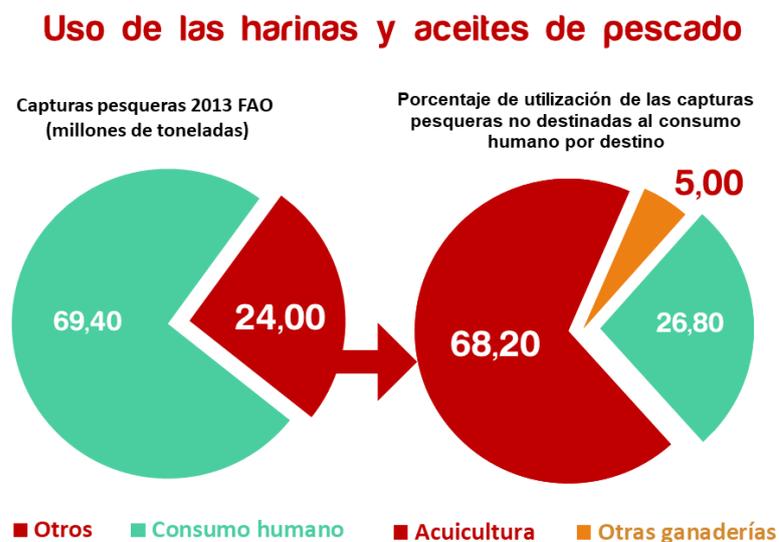


Figura 3: Uso de las harinas y aceites de pescado. 2013. (FAO, 2014).

Aunque no son pocas las señales de alerta existentes sobre la sobreexplotación del planeta, y en particular de la sobreexplotación pesquera de mares y océanos, seguimos manteniendo la pesca como modo de obtención de alimento, primero porque nos reporta pingües beneficios —al menos económicamente—, segundo porque estos son obtenidos de manera más rápida a los beneficios que nos produce la acuicultura.

Así podemos estimar de los datos de la Figura 3 que, de unas capturas totales de pescado de reducción de 24 Mt anuales, un consumo anual de 16,36 Mt se destina a la acuicultura. Y de 1,2 Mt para los piensos de otras ganaderías. Cantidades sin duda nada desdeñables.

1.6 La cadena de valor de los piensos de acuicultura

Si intentamos encontrar un trabajo que recoja la formación de los precios y la cadena de valor de estos productos pesqueros de desecho hasta su conversión en pienso para acuicultura nos va a ser difícil, al menos nosotros desconocemos que se haya abordado la cuestión.

Respecto a la cadena de producción y distribución del sector de los piensos en nuestro país, solo se ha encontrado un estudio que no aporta mucha claridad a este aspecto. ([MAPA & Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Gobierno de España., 2003](#)).

Del mismo modo que es difícil obtener datos de precios en general del coste de las materias primas por categorías de calidad, de piensos con sus formulaciones, y/o de exportaciones de piensos, y o de materias primas. Es por ello que para realizar un primer intento de este análisis se ha acudido sobre todo a comunicaciones personales y entrevistas con agentes del sector, tanto productores como productores de pienso nacionales y extranjeros. Y salvo que se mencione expresamente a alguno de ellos, lo normal ha sido comunicar los datos, pero declinando aparecer en el texto de este trabajo, o de cualquier otro.

En parte debido a que los productores de piensos para acuicultura en este país son muy pocos, y la mayor parte lo ha hecho por salvaguardar sus datos empresariales. Aspecto más que respetable, y con el que se ha comprometido este doctorando asegurando con mantener la confidencialidad de las comunicaciones, siempre que pudiera publicar los datos.

Por otro lado, los precios de venta, y de compra para el productor, están muy mediados por el origen (nacional o extranjero), tasas y aranceles aduaneros, etc. Y son muy dependientes de las fluctuaciones del comercio internacional y de los desequilibrios de precios de las monedas, o de determinadas materias primas consideradas “*commodities*” para el sector. En definitiva, las más utilizadas en acuicultura como son las harinas de pescado y los aceites de pescado, la soja, los cereales, etc. casi en su totalidad provienen del extranjero. Quizás, y sin duda los años 2020 y siguientes, durante la Pandemia mundial que ha supuesto el COVID19, y ahora con la más recientemente guerra de Ucrania no son las mejores épocas para evaluar una cadena de valor que no ha sido estudiada antes. O la formación de los precios de los piensos para el sector acuícola. Sobre todo, hasta que no se produzca una estabilidad (si se produce) en el mercado global de materias primas.

Otro de los aspectos poco analizados sobre la formación de estos precios de los piensos que es necesario analizar es que son altamente intensivos en energía, y así los piensos compuesto requieren de 750 KWh por tonelada de pienso dependiendo sobre todo del gas natural para el secado de los gránulos, etc. (Iribarren et al., 2012). Energía que se ha vuelto imposible de utilizar por los costes por lo que las fabricas están pensando reconvertirse a otro tipo de soluciones energéticas, ya que las facturas se han disparado hasta por 8 y 10 veces los costes anteriores a la guerra de Ucrania.

De todas formas, se han conseguido datos suficientes que permiten evaluar de manera razonable la cadena de valor de los piensos de acuicultura, trabajo que excede en mucho el de esta tesis pero que ayuda sin duda a realizar un mejor análisis económico sobre la sostenibilidad de las dietas evaluadas biológicamente en la sección segunda.

1.7 El precio de los cultivos

Por un lado, una vez definidos algunos aspectos de las principales entradas “*inputs*” que afectan a la acuicultura (de peces y crustáceos) marcadas por el factor común de la necesidad de aportes externos de alimento, y de semilla para realizar su producción. Y una vez que se ha abordado su insostenibilidad (de las harinas y aceites de pescado que aún se usan a unos niveles poco razonables ambientalmente) es necesario detenerse al menos brevemente en el factor salida o “*outputs*” que afectan al sector.

El principal factor de salida al igual que para cualquier producción debe ser el precio de los productos, que el productor obtiene en el mercado, que le van a permitir obtener beneficios una vez descontados los costes de producción. Estos dos parámetros sin más deben permitir obtener un análisis coste—beneficio, útil para corregir ineficiencias productivas.

Y aunque la formación de los precios del pescado y su cadena de valor es compleja hay determinadas máximas que vienen cumpliéndose desde hace siglos y que para el acuicultor le implica poder mejorar la eficiencia económica de su producción al reducir entre otros la dispersión de tallas de los cultivos, como se verá en el capítulo 3. Aspecto que se ha abordado en detalle durante el texto *vide infra*.

La propiedad, la estabulación y el control de los cultivos durante un ciclo tras otro de cultivo, implica para el acuicultor la posibilidad de realizar una planificación de los ciclos de crecimiento (y alimentación) muy ligados a las temperaturas ambientales buscando la mayor eficiencia económica de la alimentación (en el caso de la acuicultura mediterránea de primavera a octubre cuando las temperaturas son más altas). Y permite en función de este crecimiento seleccionar los momentos óptimos de la cosecha en función de las ventajas en el precio que pueda obtener en el mercado (Navidades, Semana Santa, o en verano cuando el consumo de pescado es mayor y el precio aumenta). Esto es realizado por motivos similares a las planificaciones agrícolas y ganaderas, siendo el principal motivo maximizar el beneficio a través de la búsqueda del momento óptimo de cosecha coincidente con el mayor rendimiento (en peso de los cultivos), y con el mejor precio en el mercado.

Con esta planificación del sacrificio se evita el azar y mucho más importante aún la estacionalidad (de la pesca) reiteramos inherente a las capturas, y la aleatoriedad en sus precios habitualmente sometidos a la ley de la oferta y demanda mediante subastas en lonja. Precios que se pueden ver reducidos en momentos puntuales en los que las capturas son muy superiores a la demanda.

Ya en la antigua Roma, era mayor el precio que había que pagar por las especies marinas que por las especies de ríos y lagos, y mayor el precio de los ejemplares frescos que de los salados, y también su valor estaba influenciado por su tamaño, siendo mucho mayor el precio de los de mayor tamaño que el de los más pequeños (Marzano, 2013a, 2018).

Factor que en la actualidad no ha cambiado mucho si atendemos a las estadísticas pesqueras publicadas, o los datos que se pueden obtener directamente de los mayoristas (Mercamadrid, 2022), o de las estadísticas de precios del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, o de otros organismos europeos que publican las estadísticas anuales para el sector de la pesca y la acuicultura. (European Commission. Directorate General for Maritime Affairs and Fisheries., 2021; European Commission. Joint Research Centre. & Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries., 2021). Por lo que podemos asegurar que en las costas mediterráneas mantenemos en cierto modo las mismas preferencias que mantenía Columella y los emperadores romanos, salvo por los pescados de importación y de bajo coste (como la panga) que se desconocían.

I.8 Limitaciones al presente trabajo

La mayor limitación a este trabajo ha sido poder tener una visión clara del sector de los piensos para piscicultura tanto en España como en el resto del mundo, reiterando la dificultad de obtener datos (cuando uno no es un organismo oficial), y la dificultad que tiene los organismos oficiales para obtener datos buenos. Aspecto comentado con los responsables de algunos de los informes que se han utilizado para hacer este trabajo (European Commission. Joint Research Centre. & Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries., 2021). Por ejemplo, ha sido imposible calcular unos factores de conversión de alimento para los datos mostrados tanto en el anterior informe como para otros, ni para las carpas, ni para la dorada, etc. Otras veces, como sucede con la producción de mújoles (que se producen) o de anguila en este país, por ser pocos los productores esos datos no se comunican o se comunican bajo secreto estadístico (s.e.). Tampoco se recogen para el sector de la acuicultura mediterránea o se publican datos sobre consumo de antibióticos, antiparasitarios o mortalidad. Aspecto en el que se podría mejorar y mucho en aras de la sostenibilidad del sector, aprendiendo de otros países como Noruega que son en cierto modo transparentes en mostrar esos datos.

Conectar estos datos económicos (no todo lo buenos que desearíamos), con el desarrollo de unas dietas novedosas con vocación de industriales, y que incorporan hasta un 89 % de materias primas recicladas, valorarlas económicamente, y biológicamente en una especie como el *C. labrosus* —o con los mugílidos— de bajo interés comercial para los acuicultores (y por ende para la ciencia), ha sido sobre todo un reto al principio, y después una motivación constante por los buenos resultados biológicos obtenidos.

I.9 Bibliografía.

- Aas, T. S., Ytrestøyl, T., & Åsgård, T. (2019). Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2016. *Aquaculture Reports*, 15, 100216. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100216>
- Aas, T. S., Ytrestøyl, T., & Åsgård, T. E. (2022). *Utilization of feed resources in Norwegian farming of Atlantic salmon and rainbow trout in 2020. Utnyttelse av fôrressurser i norsk oppdrett av laks og regnbueørret i 2020. Faglig sluttrapport.* (Research Report No. 2/2022; p. 40). Nofima AS. <https://nofima.brage.unit.no/nofima-xmlui/handle/11250/2977260>
- Alltech. (2022). *2022 Alltech Agri-Food Outlook* (p. 11) [Production report]. Alltech. <https://www.alltech.com/sites/default/files/2022-01/2022%20Agri-Food%20Outlook/2022%20Alltech%20Agri-Food%20Outlook%201.26.2022.pdf>
- Apromar. (2021). *Memoria de sostenibilidad. Acuicultura de España.* (p. 69). Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos. <https://apromar.es/wp-content/uploads/2021/12/MEMORIA-DE-SOSTENIBILIDAD-2021-de-Acuicultura-de-Espan%CC%83a.pdf>
- Ayer, N., Côté, R. P., Tyedmers, P. H., & Martin Willison, J. H. (2009). Sustainability of seafood production and consumption: An introduction to the special issue. *Journal of Cleaner Production*, 17(3), 321–324. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2008.09.003>
- Barazi-Yeroulanos, L. (2010). *Synthesis of Mediterranean marine finfish aquaculture: A marketing and promotion strategy.* Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Bernal, M., Breuil, C., Carlson, A., Carpentieri, P., De Rossi, F., Emma, R., Ferri, N., Morello, E., Cruz, E., Nastasi, A., Sessa, M., De Martiis, S., Vannuccini, S., Ulman, A., Ünal, V., Hidalgo, M., Vasconcellos, M., Scougal, C., Arneri, E., & Westlund, L. (2020). *The State of Mediterranean and Black Sea Fisheries 2020.* <https://doi.org/10.4060/cb2429en>
- Boonstra, W. J., & Österblom, H. (2014). A chain of fools: Or, why it is so hard to stop overfishing. *Maritime Studies*, 13(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s40152-014-0015-4>
- Campanati, C., Willer, D., Schubert, J., & Aldridge, D. C. (2022). Sustainable Intensification of Aquaculture through Nutrient Recycling and Circular Economies: More Fish, Less Waste, Blue Growth. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 30(2), 143–169. <https://doi.org/10.1080/23308249.2021.1897520>
- Cao, L., Naylor, R., Henriksson, P., Leadbitter, D., Metian, M., Troell, M., & Zhang, W. (2015). China's aquaculture and the world's wild fisheries. *Science*, 347(6218), 133–135. <https://doi.org/10.1126/science.1260149>
- Clawson, G., Kuempel, C. D., Frazier, M., Blasco, G., Cottrell, R. S., Froehlich, H. E., Metian, M., Nash, K. L., Többen, J., Verstaen, J., Williams, D. R., & Halpern, B. S. (2022). Mapping the spatial distribution of global mariculture production. *Aquaculture*, 553, 738066. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738066>
- Columella, L. I. M., Forster, E. S., & Heffner, E. H. (1954). *On agriculture: In three volumes. 2: Res rustica V - IX* (Reprinted). Harvard Univ. Press.

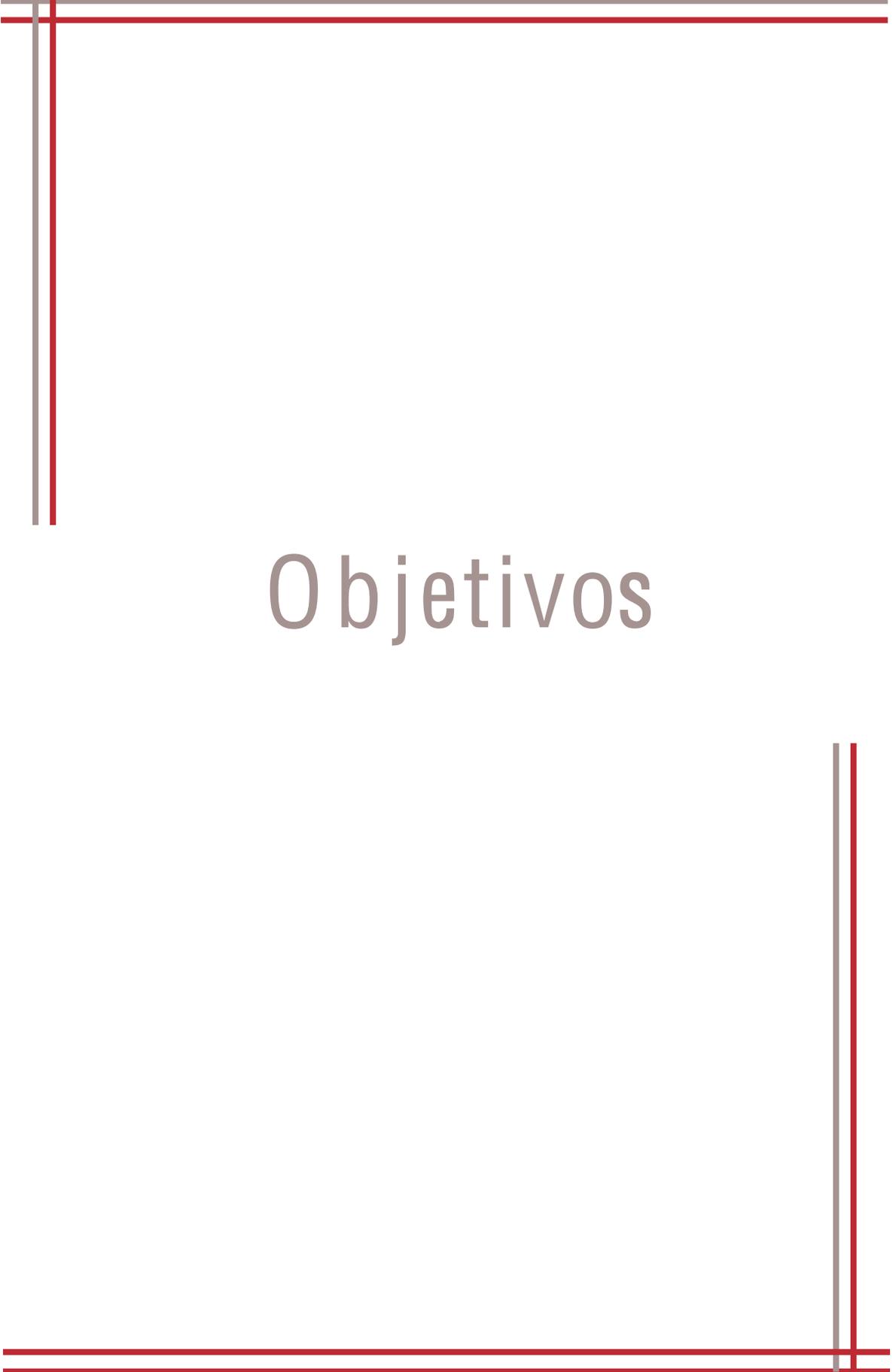
- Costa-Pierce, B. (2022). The Anthropology of Aquaculture. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2022.843743>
- Costello, C., Cao, L., Gelcich, S., Cisneros-Mata, M. Á., Free, C. M., Froehlich, H. E., Golden, C. D., Ishimura, G., Maier, J., Macadam-Somer, I., Mangin, T., Melnychuk, M. C., Miyahara, M., de Moor, C. L., Naylor, R., Nøstbakken, L., Ojea, E., O'Reilly, E., Parma, A. M., ... Lubchenco, J. (2020). The future of food from the sea. *Nature*, 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2616-y>
- Cottrell, R. S., Blanchard, J. L., Halpern, B. S., Metian, M., & Froehlich, H. E. (2020). Global adoption of novel aquaculture feeds could substantially reduce forage fish demand by 2030. *Nature Food*, 1(5), 301–308. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0078-x>
- Cottrell, R. S., Metian, M., Froehlich, H. E., Blanchard, J. L., Sand Jacobsen, N., McIntyre, P. B., Nash, K. L., Williams, D. R., Bouwman, L., Gephart, J. A., Kuempel, C. D., Moran, D. D., Troell, M., & Halpern, B. S. (2021). Time to rethink trophic levels in aquaculture policy. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1583–1593. <https://doi.org/10.1111/raq.12535>
- Crosetti, D., & Blaber, S. (2016). Chapter 18. Stock Enhancement of Mugilidae in Hawaii (USA). In *Biology, Ecology and Culture of Grey Mulletts (Mugilidae)*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19927>
- Eriksson, H., Österblom, H., Crona, B., Troell, M., Andrew, N., Wilen, J., & Folke, C. (2015). Contagious exploitation of marine resources. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 13(8), 435–440. <https://doi.org/10.1890/140312>
- European Commission. Directorate General for Maritime Affairs and Fisheries. (2021). *The EU fish market: 2021 edition*. Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2771/563899>
- European Commission. Directorate General for Maritime Affairs and Fisheries. & EUMOFA. (2021a). *Case study – Fishmeal and fish oil. Monthly highlights 4/2019*. Publications Office. <https://bit.ly/3emuCf5>
- European Commission. Directorate General for Maritime Affairs and Fisheries. & EUMOFA. (2021b). *Fishmeal and fish oil: Production and trade flows in the EU*. Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2771/062233>
- European Commission. Joint Research Centre. & Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries. (2021). *The EU aquaculture sector: Economic report 2020 (STECF 20 12)*. Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2760/441510>
- FAO. (1988). *Definition of aquaculture, Seventh Session of the IPFC Working Party of Experts on Aquaculture, IPFC/WPA/WPZ, p.1-3, RAPA/FAO, Bangkok*. Seventh Session of the IPFC Working Party of Experts on Aquaculture, Bangkok, Thailand.
- FAO. (2014). *State of the World Fisheries and Aquaculture 2014*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO. (2020a). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020*. Food & Agriculture Organization of the UN (FA. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>

- FAO. (2020b). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020: La sostenibilidad en acción*. FAO. <https://doi.org/10.4060/ca9229es> Also Available in: Chinese English Arabic French Russian
- FAO. (2022a). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022: Towards Blue Transformation*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- FAO. (2022b). *Benchmarking species diversification in global aquaculture*. Food & Agriculture Organization of the UN (FA. <https://doi.org/10.4060/cb8335en>
- Fernández Pérez, J. (2002). Consideraciones sobre la pesca romana en Hispania. *Artifex : ingeniería romana en España : Museo Arqueológico Nacional, Madrid, marzo-julio de 2002, 2002, ISBN 84-369-3567-5, págs. 331-352, 331-352.* <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1046927>
- Fry, J. P., Mailloux, N. A., Love, D. C., Milli, M. C., & Cao, L. (2018). Feed conversion efficiency in aquaculture: Do we measure it correctly? *Environmental Research Letters*, 13(2), 024017. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aaa273>
- Haberl, H., Erb, K. H., Krausmann, F., Gaube, V., Bondeau, A., Plutzer, C., Gingrich, S., Lucht, W., & Fischer-Kowalski, M. (2007). Quantifying and mapping the human appropriation of net primary production in earth's terrestrial ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(31), 12942–12947. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704243104>
- Halver, J. E., & Ashley, L. M. (1972). *Fish nutrition. 1st Edition* (1st Edition). Academic Press.
- Hansen, L. (2019). The Weak Sustainability of the Salmon Feed Transition in Norway – A Bioeconomic Case Study. *Frontiers in Marine Science*, 6, 764. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00764>
- Henriksson, P. J. G., Pelletier, N. L., Troell, M., & Tyedmers, P. H. (2013). Life Cycle Assessments and Their Applications to Aquaculture Production Systems life cycle assessment (LCA) aquaculture production systems. In P. Christou, R. Savin, B. A. Costa-Pierce, I. Misztal, & C. B. A. Whitelaw (Eds.), *Sustainable Food Production* (pp. 1050–1066). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5797-8_191
- Hughes, J. D. (2014). *Environmental problems of the Greeks and Romans: Ecology in the ancient mediterranean* (Second edition). Johns Hopkins University Press.
- Iribarren, D., Moreira, M., & Feijoo, G. (2012). Life Cycle Assessment of Aquaculture Feed and Application to the Turbot Sector. *International Journal of Environmental Research*, 6, 837–848.
- Juvenal. (2008). *The Satires*. OUP Oxford.
- Kroodsma, D. A., Mayorga, J., Hochberg, T., Miller, N. A., Boerder, K., Ferretti, F., Wilson, A., Bergman, B., White, T. D., Block, B. A., Woods, P., Sullivan, B., Costello, C., & Worm, B. (2018). Tracking the global footprint of fisheries. *Science*, 359(6378), 904–908. <https://doi.org/10.1126/science.aao5646>
- Lovatelli, A., Holthus, P. F., & Food and Agriculture Organization of the United Nations (Eds.). (2008). *Capture-based aquaculture: Global overview*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- MAPA, & Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Gobierno de España. (2003). *Análisis de la cadena de producción y distribución del sector de piensos. Diagnóstico y Análisis Estratégico del Sector Agroalimentario Español*. (p. 62). Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. <https://bit.ly/3RAI4LY>
- Marzano, A. (2013a). Demand, Prices, and Distribution. In *Harvesting the Sea: The Exploitation of Marine Resources in the Roman Mediterranean*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199675623.003.0010>
- Marzano, A. (2013b). Fishing and Roman Law. In *Harvesting the Sea: The Exploitation of Marine Resources in the Roman Mediterranean*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199675623.001.0001>
- Marzano, A. (2018). Fish and Fishing in the Roman World. *Journal of Maritime Archaeology*, 13(3), 437–447. <https://doi.org/10.1007/s11457-018-9195-1>
- Mercamadrid. (2022, August). *Estadísticas Mercamadrid. Mercado central de pescados*. Mercamadrid. <https://www.mercamadrid.es/estadisticas/>
- Metian, M., Troell, M., Christensen, V., Steenbeek, J., & Pouil, S. (2020). Mapping diversity of species in global aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 1090–1100. <https://doi.org/10.1111/raq.12374>
- Nakajima, T., Hudson, M. J., Uchiyama, J., Makibayashi, K., & Zhang, J. (2019). Common carp aquaculture in Neolithic China dates back 8,000 years. *Nature Ecology & Evolution*, 3(10), 1415–1418. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0974-3>
- National Research Council. (1981). *Nutrient Requirements of Coldwater Fishes*. The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/19731>
- National Research Council (Ed.). (1992). *Nutrient Requirements of Fish*. National Academies Press.
- Naylor, R. L., Goldberg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C. M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., & Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405(6790), 1017–1024. <https://doi.org/10.1038/35016500>
- New, M. B., & Wijkström, U. N. (2002). *Use of Fishmeal and Fish Oil in Aquafeeds: Further Thoughts on the Fishmeal Trap*. <http://www.fao.org/3/a-y3781e.pdf>
- OESA. (2016). *Guía para periodistas sobre acuicultura*. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. http://www.observatorio-acuicultura.es/sites/default/files/images/adjuntos/libros/guia_periodistas_acuicultura_w eb.pdf
- Pelletier, N., Audsley, E., Brodt, S., Garnett, T., Henriksson, P., Kendall, A., Kramer, K. J., Murphy, D., Nemecek, T., & Troell, M. (2011). Energy Intensity of Agriculture and Food Systems. *Annual Review of Environment and Resources*, 36(1), 223–246. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-081710-161014>

- Pelletier, N., Tyedmers, P., Sonesson, U., Scholz, A., Ziegler, F., Flysjo, A., Kruse, S., Cancino, B., & Silverman, H. (2009). Not All Salmon Are Created Equal: Life Cycle Assessment (LCA) of Global Salmon Farming Systems. *Environmental Science & Technology*, 43(23), 8730–8736. <https://doi.org/10.1021/es9010114>
- Péron, G., François Mittaine, J., & Le Gallic, B. (2010). Where do fishmeal and fish oil products come from? An analysis of the conversion ratios in the global fishmeal industry. *Marine Policy*, 34(4), 815–820. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2010.01.027>
- Real Academia Española. (2019). *Acuicultura | Definición de acuicultura—Diccionario de la lengua española—Edición del Tricentenario*. Real Academia Española. <https://dle.rae.es/?id=0ezYDi4>
- Shalan, M., El-Mahdy, M., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2018). Aquaculture in Egypt: Insights on the Current Trends and Future Perspectives for Sustainable Development. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 26(1), 99–110. <https://doi.org/10.1080/23308249.2017.1358696>
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2009). Fishing for Aquaculture: Non-Food Use of Small Pelagic Forage Fish—A Global Perspective. *Reviews in Fisheries Science*, 17(3), 305–317. <https://doi.org/10.1080/10641260802677074>
- Tacon, A. G. J., Metian, M., Turchini, G. M., & De Silva, S. S. (2009). Responsible Aquaculture and Trophic Level Implications to Global Fish Supply. *Reviews in Fisheries Science*, 18(1), 94–105. <https://doi.org/10.1080/10641260903325680>
- Tacon, P. S. C. (1989). *From rainbow snakes to “X-Ray” fish: The nature of the recent rock painting tradition of Western Arnhem Land, Australia* [PhD Thesis, Faculty of Arts, Australian National University]. <https://openresearch-repository.anu.edu.au/handle/1885/10074>
- Teletchea, F., & Fontaine, P. (2014). Levels of domestication in fish: Implications for the sustainable future of aquaculture. *Fish and Fisheries*, 15(2), 181–195. <https://doi.org/10.1111/faf.12006>
- Varrón, M. T., & Cubero Salmerón, J. I. (2010). *Rerum rusticarum, libri III*. Consejería de Agricultura y Pesca, Servicio de Publicaciones y Divulgación.
- Youwei, W., & Xinming, M. (Eds.). (1986). *Fan Li on pisciculture*. Beijing (China) Agricultural Press.

Este folio ha sido dejado intencionadamente en blanco.



Objetivos

El objetivo general de la presente **Tesis Doctoral** es el diseño y validación de dietas adecuadas para dorada, y el mújol o liseta que reduzca la dependencia en las dietas para acuicultura de estas materias primas a través de la sustitución parcial de la harina de pescado por subproductos del sector agroalimentario.

La sustitución por subproductos del sector agroalimentario para el cultivo de mugílidos (*Chelon labrosus*) se va a validar sobre diferentes aspectos de su cultivo: i) sus requerimientos nutricionales; ii) su estado inmunológico; y estos se van a comparar con los requerimientos ampliamente estudiados para la dorada.

Así, los resultados nos van a permitir avanzar sobre los siguientes objetivos científicos concretos:

1. Incremento del conocimiento científico sobre el mújol (nutrición, inmunología y zootecnia).
2. Incremento del conocimiento científico comparado de la dorada (vs mújol).
3. Incremento del bienestar animal, la salud y el estado inmunitario de los cultivos
4. Evaluar la máxima inclusión de subproductos agroalimentarios en dietas para acuicultura.
5. Evaluar el problema de la sustitución de harinas de pescado en las dietas para acuicultura desde una perspectiva multidisciplinar (económica y biológica).

Código qr al
repositorio de la
especie

Sección primera

Capítulo I. Materiales y métodos 1



Rodaballo

Scophthalmus maximus (Linnaeus, 1758)

griego *skopeo-ophthalmós* 'mirar-ojo', ojos al mismo lado; latín *maximus* 'muy grande' (Barriuso, 1986)

Lonja de la Línea de la concepción, 2007 (Foto: A. M. Arias)

Derechos cedidos por M. Arias, www.ictieterm.es

Sección primera:

Materiales y métodos

Capítulo I. Materiales y métodos 1

I.1 Autorizaciones administrativas

I.2 Reemplazo, reducción y refinamiento en el uso de animales de experimentación

I.3 Animales

I.4 Ensayos experimentales

I.5 Dietas

I.6 Parámetros biométricos y de eficiencia de la alimentación

I.7 Toma de muestras

I.8 Parámetros de la inmunidad humoral

I.8.1 Actividad enzimática en el suero y en el moco de la piel

I.8.1.1 Actividad antiproteasa

I.8.1.2 Actividad peroxidasa

I.8.1.3 Actividad proteasa

I.8.1.4 Cuantificación de proteínas

I.9 Parámetros de la inmunidad celular

I.9.1 Actividad peroxidasa de los leucocitos de riñón cefálico

I.9.2 Explosión respiratoria de los leucocitos de riñón cefálico

I.9.3 Actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico

I.10 Análisis de la expresión génica

I.11 Otras técnicas y consideraciones

I.12 Análisis estadístico

I.13 Bibliografía

I.1 Autorizaciones administrativas

La experimentación se ha llevado a cabo en Animalario de la Universidad de Murcia (Campus de Espinardo, Murcia; Código REGA ES300305440012) y de acuerdo al Código ético de dicha entidad. Los permisos administrativos correspondientes se han solicitado y obtenido conforme a la normativa europea sobre experimentación animal [Directiva 2010/63/UE](#) relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

Durante la realización de los estudios de Doctorado se han realizado diversos cursos que acreditan la capacidad del doctorando para la experimentación con animales y la docencia: A) Experimentación animal para doctorandos, organizado por la Escuela de Doctorado. Universidad de Murcia; y B) Diploma de formación en el curso: Formación del personal responsable para dirigir o diseñar los procedimientos de experimentación con animales, categoría C. por el Vicerrectorado de Formación e Innovación de la Universidad de Murcia.

Además, se ha obtenido la autorización administrativa necesaria expedida por la Dirección General de Ganadería, Pesca y Acuicultura, Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente de la Región de Murcia (España). N° de Certificado 2021RCI0034 “Certificado de reconocimiento de la capacitación para manejar animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. ([Orden ECC/566/2015](#)). Para anfibios y peces (Eutanasia de los Animales y Realización de procedimientos), y Diseño de Proyectos y Procedimientos para todas las especies.

I.2 Reemplazo, reducción y refinamiento (3R) en el uso de animales de experimentación

Para la realización de los experimentos se han utilizado peces de diferentes especies, de los cuales se ha sacrificado el número mínimo viable por motivos estadísticos, recuperándose el resto para otros trabajos cuando esto ha sido posible.

Durante el desarrollo de la experimentación se ha tenido en cuenta los principios de Reemplazo, Reducción y Refinamiento —conocidos como las “tres R” de la experimentación animal—. Así, se ha tenido presente la necesidad de reducir en la medida de lo posible el número de ejemplares que se sacrifican durante, o al finalizar los experimentos. De entre las posibles técnicas de biología molecular y de toma de muestras biológicas se han seleccionado aquellas menos invasivas para los animales. Y en el caso de ser esto factible, y de acuerdo a los objetivos fijados para de cada experimento, se ha evitado la eutanasia de los sujetos experimentales cuando ha sido posible. Dada la necesidad de evaluar la inmunidad celular, la eutanasia ha sido en estos casos inevitable, ya que, la obtención de células del riñón cefálico obliga a realizar la disección de la cabeza del animal.

En todos los experimentos se han utilizado métodos que evitan o ayudan a reemplazar el uso de animales (Reemplazo), métodos que reducen el número de animales (Reducción) o que minimizan el dolor o angustia y suponen una mejora en el bienestar animal (Refinamiento). El difícil equilibrio entre la consideración estadística, y el número de animales utilizados se ha logrado por: i) la formación recibida por el doctorando tanto en los cursos mencionados anteriormente; ii) la formación impartida dentro del grupo de investigación; y iii) por la experiencia del doctorando en el manejo de animales que ha permitido la mejora de las condiciones de estabulación de los animales en el Animalario. Este equilibrio reiteramos ha permitido obtener unos resultados estadísticos consistentes con el uso de un menor número de animales.

En la medida de lo posible se ha minimizado la realización de traslados, manejos o manipulaciones innecesarias. Se ha tenido en cuenta el bienestar animal y reducido las posibles situaciones de estrés (*v.g.* muestreos, o manipulaciones en periodos inferiores a los treinta días).

Así, se han utilizado las técnicas menos invasivas posibles mediante para la realización y medida de las actividades enzimáticas sobre muestras de moco de la piel y suero, procedimientos que se ilustran con las siguientes imágenes (Figura 6 y 7).



Figura 6: Obtención del moco de la piel de un ejemplar de dorara (*Sparus aurata*). Autor: Luciano Vílchez Gómez (noviembre 2018)



Figura 7: Obtención de la sangre de un ejemplar de dorara (*Sparus aurata*). Autor: Luciano Vílchez Gómez (noviembre 2018)

Como ejemplo de estas técnicas que no implican eutanasia, y que son habitualmente utilizadas por el grupo de investigación donde se ha desarrollado este la presente tesis doctoral. Las Figuras 6 y 7 ilustran el proceso de toma de muestras biológicas perfectamente. Al animal adormecido mediante un baño en agua con anestésico, se le pasa rápidamente una espátula limpia, en el sentido de las escamas para no producir heridas o descamaciones, y así, la muestra de moco es recogida en un recipiente sin causar sufrimiento (Figura 6). En la Figura 7 se puede visualizar como se obtiene una cantidad suficiente de sangre para realizar posteriormente técnicas analíticas sobre el suero, o en su caso el plasma de la sangre. Si la cantidad recogida de muestra es pequeña, y los animales no son excesivamente pequeños esta técnica no implica la muerte. Y una vez realizada la extracción de las muestras los ejemplares se recuperan sin problemas y con rapidez de los efectos de la anestesia al introducirlos en agua limpia sin anestésico.

También se han realizado muestreos biométricos que no implican el sacrificio de animales. Estos muestreos se han realizado mediante la captura de imágenes digitales (Figura 8) con una cámara fotográfica (Canon EOS, USA) montada sobre un trípode estable, lo que permite acortar los tiempos que el animal anestesiado está fuera del agua, y el posterior procesado de los datos mediante programas informáticos estandarizando las medidas entre unos ejemplares y otros. Para su procesado se han utilizado programas de código abierto como ImageJ y FIJI (Schindelin et al., 2012; Schneider et al., 2012).



Figura 8: Fotografía realizada a un *Chelon labrosus* para su posterior análisis informático de las medidas biométricas. Autor: Luciano Vílchez Gómez (noviembre 2018)

Esta técnica para realizar los muestreos biométricos permite que, junto a la imagen digital del pez y mediante el uso de etiquetas preparadas con anterioridad al muestreo se registren la identificación clara del pez, del grupo experimental, la fecha de trabajo, o marcas de identificación del animal (si las tuviese). Permite además poder realizar cualquier otra medida de morfología de partes del cuerpo, distancias entre diferentes puntos, áreas, perímetros, etc. Como, por ejemplo, del área de las heridas y su proceso de cicatrización como es el caso de un trabajo actualmente en preparación realizado por el doctorando, la Dra. Ceballos-Francisco y otros colaboradores (trabajo sin publicar). Así, este tipo de metodología y nuevas técnicas de análisis biométrico mediante imágenes fotográficas pueden ser de gran utilidad en los muestreos de fauna acuática, de la población de especies invasoras, o en evaluación de biomasa de las pesquerías, etc.

También el uso de estas técnicas permite acortar considerablemente los tiempos de muestro y de exposición del pez al aire. Exposición que aun estando anestesiado el sujeto experimental es inevitable. Es por tanto interesante utilizar técnicas que reducirla en el tiempo para interferir con el estado de salud, o nivel de estrés lo mínimo posible (Cámara-Ruiz et al., 2022; Khansari et al., 2018, 2019)

El crecimiento de los animales es uno de los mejores parámetros posibles para evaluar tanto el estado nutricional como el de salud de los animales, aunque este a veces haya quedado relegado por otras técnicas más invasivas o que implican sacrificio (Du & Turchini, 2021). Tanto los procedimientos clásicos (biometrías) —que son de bajo costo y de fácil estandarización permitiendo su comparación posterior con otros estudios—, como las técnicas de biología molecular más avanzadas realizadas sobre el suero, plasma y el moco de los peces también deberían tener mayor peso específico en todos los trabajos científicos que impliquen animales.

Es innegable la importancia de las técnicas en las que priman la reducción de la eutanasia o sacrificio, y que estas deberían tener reiteramos mayor peso específico en la investigación frente a cualquier otra que conlleve la muerte de los sujetos experimentales, desde la hora de diseñar los experimentos como de ejecutarlos.

I.3 Animales

Para la realización de los experimentos con la especie dorada (*Sparus aurata*), los ejemplares de diferentes tallas se obtuvieron de una granja local (Águilas, Murcia, España), y trasladados al Animalario de la Universidad de Murcia después de obtener los permisos sanitarios y veterinarios correspondientes.

Todos los ejemplares eran de diferentes tallas, y lotes, como se recogen en los diferentes capítulos experimentales en el apartado referente a los peces. Los ejemplares en talla de pre-engorde fueron aleatoriamente seleccionados entre peces que posteriormente serían destinados para el engorde en piscifactorías de las regiones de Murcia, Valencia y Andalucía. Ninguno de los peces fue vacunado con anterioridad. Todos los ejemplares gozaban de un excelente estado de nutrición / salud, ausencia de heridas, patologías visibles, o parásitos. Tampoco presentaban ningún tipo de malformaciones. Aun así, todos los animales fueron estabulados y previo a la realización de los experimentos puestos en cuarentena sanitaria al menos durante quince días (siendo lo habitual más de treinta). Durante estos periodos de cuarentena no se produjo ningún episodio de mortalidad o enfermedad. Tampoco se produjeron episodios de mortalidad durante la realización de los experimentos.

Los ejemplares de peces de la familia de los mugílidos fueron desinteresadamente cedidos por el Centro Integrado Público de Formación Profesional Marítimo Zaporito (CPIFP Marítimo Zaporito), (San Fernando, Cádiz, España), siendo ejemplares de segunda generación (F2) provenientes de ejemplares reproductores con los que cuenta el centro. Reiterando mi agradecimiento tanto a su directora Doña Victoria Oliver Vargas, como al Maestro en Acuicultura D. Juan Antonio Calderón, ya que, sin su apoyo, y experiencia con estas especies no habría sido posible este trabajo al no existir en España instalaciones dedicadas a la reproducción de mugílidos, y tampoco existen instalaciones que se dediquen al cultivo comercial de ejemplares reproducidos en cautividad.

Todos los animales donados por el CIPFP Marítimo Zaporito gozaban de excelente salud. Es aplicable a los mugílidos lo expuesto anteriormente para las doradas, respecto a las cuarentenas sanitarias, o las estabulaciones y durante toda la fase de experimentación realizada con estas especies.

I.4 Ensayos experimentales

La experimentación con animales se desarrolló durante los cursos 2017-2018, 2018-2019, 2019-2020 del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de Murcia, España.

Las tasas de alimentación fueron fijadas en función de la especie, talla y dietas que se le iba a suministrar a los peces. El horario de alimentación se fijó en función de los hábitos diurnos de las especies empleadas durante la experimentación.

La distribución de los animales por tanque/acuario, de las diferentes dietas experimentales (tratamiento) por tanque, así como la selección de animales para el sacrificio se realizaron de manera totalmente aleatoria. Los muestreos de peso y crecimiento se realizaron sobre todos los ejemplares puestos en experimentación por lo que el tamaño de la población estadística (n) en estos datos siempre será mayor o igual —en el caso de experimentos con pocos ejemplares— que en el resto de técnicas de biología molecular. En algunos experimentos la población (n) es igual dada la dificultad de obtener ejemplares de la familia *mugilidae* por lo que en estas experimentaciones el número de ejemplares se redujo a los mínimos estadísticamente viables, frente a los realizados con dorada en los que el número de animales fue mayor.

Las condiciones de temperatura fueron de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ son similares para todos los experimentos al compartir un mismo espacio climatizado en el Animalario de la Universidad de Murcia. El fotoperiodo para todos los experimentos fue de 12 horas luz, 12 horas de oscuridad. Las condiciones del agua fueron analizadas periódicamente utilizando tiras reactivas *Speedy test* (Prodac, UK) considerándose dentro de unos parámetros normales para el bienestar de los peces (Friend of the Sea, 2014, 2016), (Amonio (NH_4) $\leq 1\text{ mg/L}$; nitratos (NO_3^-) $\leq 15\text{ mg/L}$; Nitrito (NO_2) $\leq 1\text{ mg/L}$).

Los niveles de salinidad del agua donde se realizó la experimentación puede variar de manera considerable entre experimentos. En uno de estos experimentos los diferentes grupos experimentales se mantuvieron a una salinidad de 0 ‰ frente a un 36 ‰, lo que podríamos considerar condiciones de agua dulce y/o marinas respectivamente (capítulo 7). En caso de no expresarse en el capítulo experimental correspondiente la salinidad del agua para todos los tratamientos/grupos se estableció en un 28 ‰.

Todos los experimentos se han llevado a cabo en sistemas de recirculación, bien individuales (por acuario) pero con idénticos equipos circulación del agua, filtración, y depuración para todos los tanques, o en sistemas agrupados por grupos de tanques de manera que las condiciones experimentales fueran análogas en todos los grupos y acuarios.

Cada capítulo de esta sección corresponde a un experimento realizado, con sus oportunas particularidades de diseño experimental para adecuar las condiciones, la población experimental, etc. al objetivo del experimento (tallas, grupos, sistemas y/o acuarios, etc.). Por eso una vez tenidas en cuenta (para todos los experimentos) las consideraciones generales de este apartado —[I.4 Ensayos experimentales](#)—, se debe tener en cuenta también el apartado referente al diseño experimental particular incluido en cada experimento/capítulo donde se recoge si existe alguna particularidad concreta diferente a las condiciones relacionadas con anterioridad.

I.5 Dietas

Se diseñaron y formularon varias dietas experimentales en función de los requerimientos nutricionales analizados de la bibliografía científica para cada especie sobre las que se ha llevado a cabo la experimentación, y las experiencias previas realizadas por el doctorando. Y, en función de las materias primas disponibles localmente para ello. Los materiales y métodos correspondientes a las dietas por su extensión son descritas en el capítulo siguiente: [Capítulo II, Materiales y métodos 2. Formulación, fabricación, selección y composición de los piensos experimentales](#).

Durante la fase experimental de este trabajo se han utilizado diferentes dietas, de ellas algunas han sido industriales y/o comerciales compradas a la filial de del grupo Nutreco (Países Bajos) en España, Skretting España S.A. (Burgos, España), en adelante Skretting. El grupo Nutreco a través de sus filiales Skretting y Trouw nutrition, es uno de los mayores proveedores de alimento para acuicultura del mundo con más de 3.500 empleados, una producción de 2,6 Mt anuales y fábricas en dieciocho países ([Skretting, 2022](#)). El grupo Nutreco forma parte del conglomerado empresarial SHV (Países Bajos) con filiales en los sectores de la energía, ingeniería, supermercados y alimentación, etc. El resto de dietas han sido diseñadas desde cero y fabricadas en las instalaciones del animalario de la Universidad de Murcia por la empresa Biothesan, S.L.U (Granada, España) propiedad del doctorando.

I.6 Parámetros biométricos, crecimiento y eficiencia de la alimentación

A partir de los datos obtenidos durante los muestreos biométricos los días (x) de peso (P), ($g \pm 0,01$) y la ración diaria proporcionada a cada grupo experimental se pudieron calcular los parámetros relativos al crecimiento de los sujetos experimentales, así como del aprovechamiento de la alimentación proporcionada según las expresiones que a continuación se detallan:

Incremento de peso (ΔP): Como diferencia neta de peso entre tiempos experimentales (t) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta P = \text{Peso húmedo final (g)} - \text{Peso húmedo inicial (g)}$$

Tasa de crecimiento específico (TCE): (en inglés SGR o *specific growth rate*). Como la relación del porcentaje diario de crecimiento para los intervalos experimentales de tiempo (t) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{TCE} = [(\ln \text{Peso final (g)} - \ln \text{Peso inicial (g)}) / \text{número de días (día)}] * 100$$

Índice de conversión alimenticia (ICA): (en inglés FCR o *food conversion ratio*) Como relación entre la alimentación suministrada y el incremento de peso para los intervalos de tiempo (t) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{FCA} = \text{Alimento total suministrado (g)} / \Delta P \text{ (g)}$$

Tasa de eficiencia proteica (TEP): Como la relación entre la proteína suministrada con la dieta y el incremento de peso para los intervalos de tiempo (t) acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{TEP} = \Delta P \text{ (g)} / \text{proteína suministrada con la dieta (g)}$$

Tasa de eficiencia lipídica (TEL): Como la relación entre la grasa suministrada con la dieta y el incremento de peso para los intervalos de tiempo (t) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{TEL} = \Delta P \text{ (g)} / \text{lípidos suministrados con la dieta (g)}$$

Tasa de eficiencia energética (TEE): Como la relación entre la energía bruta de combustión (Kcal/g) proporcionada con la dieta y el incremento de peso para los intervalos de tiempo (t) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{TEE} = \Delta P \text{ (g)} / \text{Kcal (g) suministrados con la dieta (g)}$$

I.7 Toma de muestras biológicas

Una vez iniciado los experimentos se recogían diferentes muestras biológicas, a tiempo inicial y al menos en el tiempo final, intentando que todos los experimentos realizados tengan un máximo de correspondencia entre ellos. Todos los ejemplares fueron pesados y medidos al inicio de los experimentos y también al final, pudiendo existir algún punto de muestreo intermedio (en el caso de que la duración del experimento así lo exigiera).

Para la toma de muestras se siguió de manera general el procedimiento siguiente: Se seleccionaron aleatoriamente y sucesivamente ejemplares de cada tratamiento ($n=x$). Dichos ejemplares se anestesiaron por inmersión en agua con 2-fenoxi-etanol a una proporción de 3 mililitros (ml) cada 5 litros de agua (l) recomendada para estas especies.

Una vez completamente anestesiados los animales se procedía a tomar una muestra de moco de la piel de acuerdo con el método descrito por [Guardiola et al. \(2014\)](#) (Figura 6). Respecto a las muestras de moco de la piel, dichas muestras fueron centrifugadas a 10.000 r.p.m., a 4° C durante 15 minutos para separar escamas u otros restos. Después el sobrenadante fue recogido y conservado a -80° C hasta su uso.

Una vez recogido el moco, se procedía a pesar en una báscula (Europe 600, Gibertini. Error \pm 0,01 g) y a medir mediante la realización de una fotografía sobre un papel milimetrado laminado en mate para evitar reflejos (Figura 8). Imagen tomada con una cámara digital (Canon EOS, EEUU) montada sobre un trípode (Manfrotto, Italia) para su posterior procesamiento de imagen con el programa de código abierto ImageJ + FIJI. ([Schindelin et al., 2012](#); [Schneider et al., 2012](#)).

Después se procedía a la extracción de sangre en la zona posterior de la espina dorsal (Figura 7), las muestras obtenidas se dejaron coagular a 4° C durante cuatro horas, para posteriormente realizar una centrifugación a 10.000 r.p.m a 4° C durante diez minutos, obteniendo el suero sobrenadante. El suero se transfería a otros tubos de microcentrífuga y para su conservación a -20° C hasta su posterior análisis en los laboratorios de la Facultad de Biología. A continuación, se realizaba la disección del animal obteniendo —dependiendo del experimento— distintos tejidos: piel, hígado, etc., los cuales se procedía a introducirlos en tubos de microcentrífuga para su congelación en nitrógeno líquido, y posterior conservación a -80° C hasta su procesamiento y tratamiento.

En la disección el primer tejido que se obtiene es el riñón cefálico (Figura 9), este se extrae de los ejemplares en condiciones de esterilidad, y se introduce en medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), sRPMI-1640 (Sigma) suplementado con 0,35% de cloruro sódico con el fin de ajustar la osmolaridad del medio (280 mOsm), 100 µg/ml de penicilina (Flow), 100 µg/ml de estreptomycin (Flow) y un 3% de suero bovino fetal (SBF, Gibco) con 10 µg/ml de heparina (Sigma). De esta manera se obtienen suspensiones celulares mediante el tamizado de los fragmentos de riñón cefálico a través de mallas de nylon (diámetro de poro 100 µm) (Figura 10).

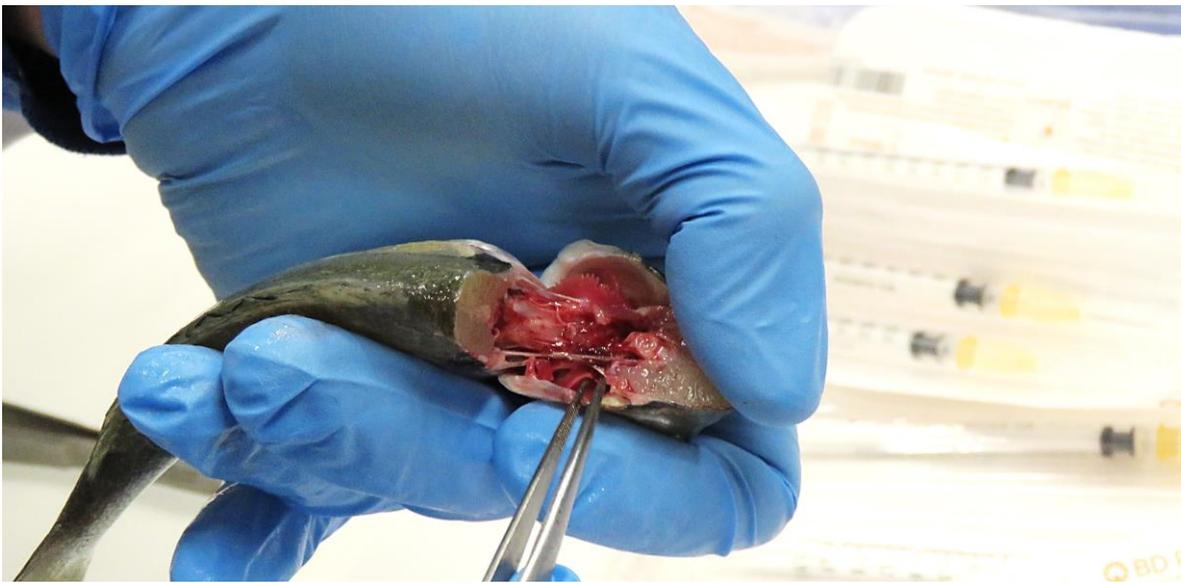


Figura 9: Extracción del riñón cefálico de un ejemplar de dorada (*Sparus aurata*). Autor: Luciano Vílchez Gómez (noviembre 2018)

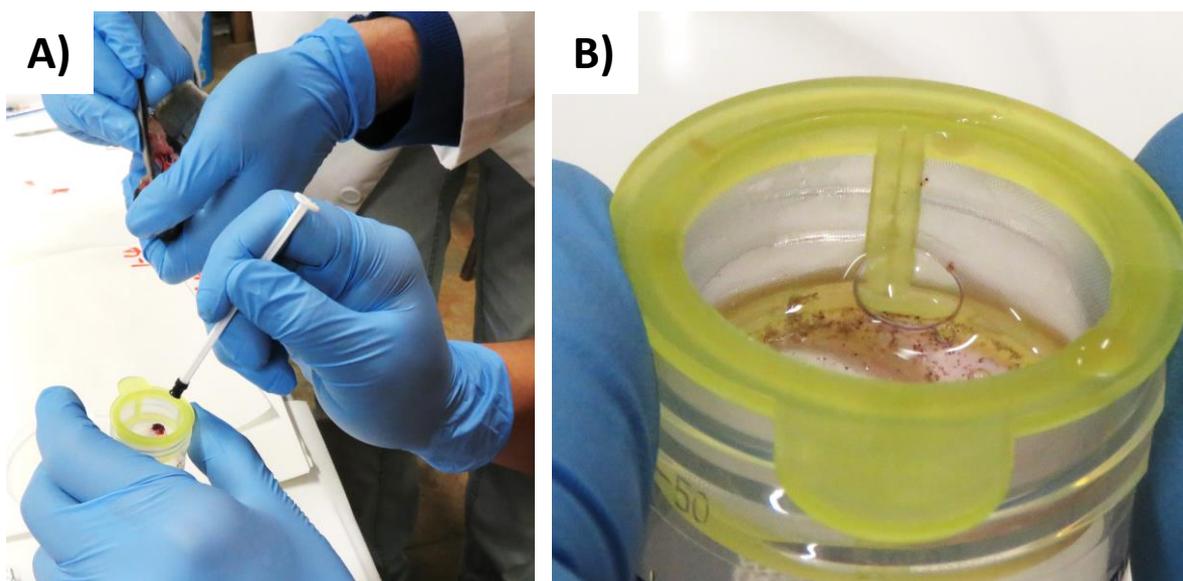


Figura 10: A) Extracción del riñón cefálico de un ejemplar de dorada (*Sparus aurata*); B) tamizado de las células obtenidas para su posterior uso en el laboratorio y evaluación de la inmunidad celular. Autor: Luciano Vílchez Gómez (noviembre 2018)

Después estas muestras son centrifugadas (1.500 r.p.m., 10 min, 25° C) obteniendo los leucocitos del riñón cefálico. Estas células obtenidas son recogidas, y re-suspendidos de nuevo en medio sRPMI-1640 esta vez sin heparina (medio de lavado), y centrifugados nuevamente (1.500 r.p.m., 10 min, 25° C). Tras tres lavados, los leucocitos recogidos y re-suspendidos son contados con un contador de células (Beckham Coulter Z2), y ajustados a 10^7 células/ml. Se comprueba la viabilidad celular (que sea siempre superior al 90%) lo cual se determina mediante el test de exclusión del azul tripán (Phillips, 1973). Las suspensiones celulares obtenidas se emplean inmediatamente para evaluar la inmunidad celular (actividad fagocítica, actividad peroxidasa y explosión respiratoria). *Vide infra*. [I.9 Parámetros de la inmunidad celular](#).

I.8 Parámetros de la inmunidad humoral

I.8.1 Actividad enzimática en el suero y en el moco de la piel

I.8.1.1 Actividad antiproteasa

La actividad antiproteasa total se determinó por la capacidad del suero para inhibir la actividad tripsina con algunas modificaciones de acuerdo a [Guardiola et al. \(2014\)](#). Brevemente, 10 μl de suero o de moco se incubaron durante 10 minutos a 22° C con 10 μl de solución estándar de tripsina (5 mg ml^{-1} , en bicarbonato sódico 60 mM, pH 8,3). A continuación, se añadieron 100 μl de bicarbonato de amonio 100 mM y 125 μl de azocaseína al 2% (en bicarbonato de amonio 100 mM) y las muestras se incubaron durante 120 minutos a 22° C. Finalmente, se añadieron 250 μl de TCA (ácido tricloroacético) al 10% y se realizó una nueva incubación durante 30 min a 22° C. La mezcla se centrifugó a continuación (10.000 r.p.m., 5 min) siendo los sobrenadantes transferidos a una placa de 96 pocillos en triplicado que contenía 100 μl en cada pocillo de NaOH 1 N, y la absorbancia leída a 450 nm usando un lector de microplacas (BMG, Fluoro Star Galaxy). En lugar de suero y tripsina como blanco de la lectura se puso tampón bicarbonato de amonio mientras que la muestra de referencia fue bicarbonato de amonio en lugar de suero. Se calculó el porcentaje de inhibición de la actividad de tripsina para cada muestra en comparación con las muestras de referencia.

I.8.1.2 Actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa fue determinada siguiendo la metodología de [Quade & Roth \(1997\)](#) y [Guardiola et al. \(2014\)](#). Se dispusieron 5 μl de suero o 30 μl de moco en placas de 96 pocillos y se adicionaron 45 μl de tampón Hanks (HBSS, Sigma) sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , o 120 μl de tampón en el caso del moco, a los que se añadieron 50 μl de hidrocloreuro de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, 10 mM, Sigma) y 50 μl de H_2O_2 (5 mM, Sigma). Transcurridos 50 segundos de la reacción, el cambio de color fue detenido mediante la adición de 50 μl de ácido sulfúrico (2 M) (Sigma), midiendo inmediatamente después la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro (BMG, Fluoro Star Galaxy). Se introdujeron muestras control que contenían TMB y H_2O_2 , pero no suero, ni moco que se usaron como blancos. La alteración de la absorbancia más de 1 puede definirse como una unidad de peroxidasa. Los resultados finales se expresaron como unidades ml^{-1} .

1.8.1.3 Actividad de la lisozima

La actividad de la lisozima se midió de acuerdo con el método turbidimétrico descrito por [Guardiola et al. \(2014\)](#) con algunas modificaciones. Brevemente, se colocaron 20 μl de suero en placas de 96 pocillos de fondo plano. A cada pocillo se añadieron 180 μl de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado (0,2 mg ml^{-1} , Sigma) en fosfato sódico 40 mM (pH 6,2) como sustrato de lisozima. Como blancos de cada muestra, se añadieron 20 μl de suero o de moco a 180 μl de tampón fosfato sódico. La absorbancia a 450 nm se midió después de 20 minutos a 35°C en un lector de microplacas (BMG, Fluoro Star Galaxy). Las cantidades de lisozima presentes en suero se obtuvieron a partir de una curva estándar hecha con lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL, Sigma) a través de diluciones en serie en el tampón anterior. Los valores de lisozima en suero se expresan como $\mu\text{g ml}^{-1}$ equivalente de actividad HEWL

1.8.1.4 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas de cada muestra se llevó a cabo mediante el método de Bradford descrito en [Bradford \(1976\)](#) consistente en la cuantificación de la unión de un colorante, el Azul de Coomassie G-250, a la proteína, comparando esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar, para lo que se utilizó albúmina de suero bovino (BSA, Sigma). La medición de la absorbancia se llevó a cabo en un espectrofotómetro (BMG, Fluoro Star Galaxy) a 595 nm tanto de las muestras como de la curva de calibración de la proteína estándar. Con los resultados de la curva se interpolaron los resultados de absorbancia por muestra obteniendo la concentración de proteínas para cada muestra.

I.9. Parámetros de la inmunidad celular

I.9.1 Actividad peroxidasa de los leucocitos del riñón cefálico

El contenido de peroxidasa de los leucocitos fue determinado siguiendo la metodología de [Rodríguez et al. \(2003\)](#). El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos de fondo plano, colocando en cada pocillo 5 μ l de la suspensión de leucocitos. Estos leucocitos fueron lisados mediante la incubación con 50 μ l de bromuro de cetiltrimetilamonio al 0,02 % (CTAB, Sigma) en agitación a 40 ciclos/min en un agitador de placas (IUL) durante 10 min. Posteriormente se adicionaron 50 μ l de TMB (20 mM) y 50 μ l de H₂O₂ (5 mM) y, transcurridos 50 segundos la reacción fue parada mediante la adición de 50 μ l de ácido sulfúrico (2 M). La absorbancia a 450 nm fue medida en un espectrofotómetro (BMG, Fluoro Star Galaxy). Se introdujeron muestras control que contenían TMB y H₂O₂ pero sin leucocitos.

I.9.2 Explosión respiratoria de los leucocitos del riñón cefálico

La explosión respiratoria fue estudiada mediante quimioluminiscencia, siguiendo la metodología de [Bayne & Levy \(1991\)](#). Para este ensayo se prepararon disoluciones de trabajo de 1 mg/ml de forbol miristato acetato (PMA, Sigma) en etanol y de 10⁻² M de luminol (Sigma) en dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma), que fueron almacenadas a -20° C y 4° C, respectivamente. A partir de estas disoluciones se prepararon otras que contenían conjuntamente PMA y luminol a unas concentraciones finales de 1 μ g/ml y 10⁻⁴ M, respectivamente, en tampón Hanks (HBSS) con Ca²⁺ y Mg²⁺. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos, poniendo 100 μ l por pocillo de la suspensión de leucocitos. A continuación, se adicionaron a cada pocillo 100 μ l de la disolución de PMA y luminol. Las placas fueron agitadas e inmediatamente leídas en un fluorímetro (BMG, Fluoro Star Galaxy) que fue programado para realizar mediciones en 30 ciclos de 2 min cada uno. La cinética de las reacciones fue analizada y la pendiente máxima de cada curva estimada. También se introdujeron controles consistentes en la adición a cada muestra de una disolución que contenía luminol pero no PMA, y un control con todos los reactivos pero sin células del riñón cefálico.

I.9.3 Actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico

La actividad fagocítica de los leucocitos se analizó mediante citometría de flujo conforme a la técnica descrita en [Esteban et al. \(1998\)](#). Para ello se utilizaron levaduras inactivadas por calor y liofilizadas, (*Saccharomyces cerevisiae*, cepa S288C) que previamente fueron marcadas con fluoresceína-5-isotiocianato o isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma). Después de marcarlas las levaduras se lavaron con medio RPMI suplementado (sRPMI). sRPMI-1640 (Sigma) suplementado con 0,35 % de cloruro sódico con el fin de ajustar la osmolaridad del medio (280 mOsm), 100 µg/ml de penicilina (Flow), 100 µg/ml de estreptomicina (Flow) y un 3 % de suero bovino fetal (SBF, Gibco) con 10 µg/ml de heparina (Sigma). De esta manera se obtienen suspensiones celulares mediante el tamizado de los fragmentos de riñón cefálico a través de mallas de nylon (diámetro de poro 100 µm) y se ajustaron a una concentración celular de 5×10^7 células ml^{-1} en dicho medio. La incubación se realizó en placas de 96 pocillos de fondo plano, poniendo 100 µl de la suspensión de leucocitos a los que se adicionaron 60 µl de la levadura previamente marcada. Las muestras fueron centrifugadas (1.500 r.p.m., 5 min, 22° C), mantenidas en oscuridad 5 min más, resuspendidas e incubadas nuevamente a 22° C durante 30 min. Tras este periodo se detuvo la fagocitosis colocándolas en hielo y adicionando a cada muestra 500 µl de tampón fosfato salino (*Phosphate-Buffered saline* PBS) (Gibco) a 4° C. La fluorescencia de las levaduras no ingeridas fue bloqueada por adición de 40 µl de una solución de azul tripán al 4% en tampón fosfato salino (PBS).

Para los análisis se utilizó un clitómetro de flujo (Becton Dickinson) con un láser de argón de argón ajustado a λ 488 nm. El contador de células se ajustó a 10.000 células, que se adquirieron a una velocidad de 300 células s^{-1} . Los datos se recogieron en forma de dispersión lateral de dos parámetros (granularidad) (SSC) y dispersión hacia adelante (tamaño) (FSC), y fluorescencia verde (FL1) punto tramas o histogramas se hicieron en un sistema computerizado. Los histogramas de fluorescencia se representaron en una escala logarítmica. El clitómetro fue ajustado para analizar los leucocitos a los valores más altos de SSC y FSC. La capacidad fagocítica se definió como el porcentaje de células con una o más bacterias ingeridas (células fluorescentes verdes-FITC) dentro de la población celular fagocítica mientras que la capacidad fagocítica era la intensidad media de fluorescencia. El estudio cuantitativo de los resultados se realizó utilizando la opción estadística del Paquete de Software Lysis (Becton Dickinson).

I.10 Análisis de la expresión génica

Para el análisis de la expresión génica se llevaron a cabo una serie de pasos:

1. Extracción de ARN: El proceso de extracción de ARN se efectuó en una campana de extracción de gases. Las muestras de tejido que habían sido congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80°C fueron descongeladas, se les añadieron $500\ \mu\text{L}$ de reactivo TRIzol (Thermo Fisher Scientific) y fueron homogeneizadas empleando un homogeneizador Polytron (Kinematica). Se añadieron $100\ \mu\text{L}$ de cloroformo y fueron incubadas durante 5 min, se agitaron los tubos durante 15 s, se dejaron incubar durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugaron ($15\ \text{min}$, $14.000\ \times g$, a 4°C) para separar la solución obtenida en tres fases, quedando proteínas y lípidos abajo, una inter-fase central de ADN y, una fase superior, acuosa, que contiene el ARN. Se transfirió la fase acuosa a nuevos tubos Eppendorf y se añadieron $500\ \mu\text{L}$ de isopropanol frío para precipitar el ARN. Se agitaron ligeramente, se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron nuevamente ($14.000\ \times g$, 4°C). Se descartaron los sobrenadantes y se retiró el isopropanol. Se añadieron $700\ \mu\text{L}$ de etanol (75% en agua libre de RNasas) a cada tubo y se centrifugaron ($8.000\ \times g$, $5\ \text{min}$, 4°C), este proceso fue repetido dos veces. Al retirar los sobrenadantes se encontraron posos de ARN en el fondo de los tubos. Se retiró el etanol y se introdujeron los tubos en una estufa (55°C , $30\ \text{min}$) para que se evaporasen los restos de etanol. Los posos se re-suspendieron en $20\ \mu\text{L}$ de agua destilada libre de RNasas.

Posteriormente, el ARN de cada muestra se cuantificó en un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). La proporción 260/280 indica la presencia de proteínas o fenoles cuando el valor es inferior a 2,0; y la proporción 260/230 nos indica la pureza del ácido nucleico, esperando unos valores entre 2,0 y 2,2. Todas las muestras mostraban proporciones 260/280 y 260/230 correspondientes a un ARN puro. De cada muestra, se usó $1\ \mu\text{g}$ de ARN para realizar la retrotranscripción y los tubos se conservaron nuevamente a -80°C .

2. Retrotranscripción: La retrotranscripción consiste en el paso de ARN a ADN complementario usando una enzima llamada transcriptasa reversa o retrotranscriptasa. El ADN obtenido mediante este método se denomina cADN. El primer proceso fue una limpieza de nuestro ARN de DNasas, añadiendo $1\ \mu\text{L}$ de *buffer* con $1\ \mu\text{L}$ de DNasa I por cada muestra. Se incubó durante $30\ \text{min}$ en el termociclador (Eppendorf) a 37°C . Se añadió

1 μ L de solución *Stop* a la muestra para detener la reacción. En el termociclador, se incubaron las muestras a 65° C durante 10 minutos para inactivar la DNasa I y después se mantuvieron a 4° C. A cada muestra, se añadió 1 μ L de Oligo dT12-18 y 1 μ L de dNTPmix 10 mM. Posteriormente, se añadieron 4 μ L de *first strand buffer 5X*, 1 μ L de DTT, 1 μ L de agua libre de DNasas y RNasas y 0,75 μ L de la enzima SuperScript IV (SSIV) a cada muestra. En el termociclador, se incubaron las muestras a 50° C durante 10 minutos y, posteriormente, a 80° C durante otros 10 minutos, para inactivar la reacción. Las muestras de piel, se re-suspendieron los 20 μ L de cDNA en 180 μ L de agua libre de RNasas y las muestras de tejido intestinal en 480 μ L. Las muestras de cDNA se almacenaron a -20° C.

Tabla 1: Números de acceso de genes y secuencias de cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica

Nombre del Gen	Abreviatura	n° GenBank	Secuencia del primer (5'→3')
Componente 3 del complemento	<i>c3</i>	CX734936	F: ATAGACAAAGCGGTGGCCTA R: GTGGGACCTCTCTGTGGAAA
Ciclooxigenasa 2	<i>cox-2</i>	AM296029	F: GAGTACTGGAAGCCGAGCAC R: GATATCACTGCCGCCTGAGT
Hepcidina	<i>hamp</i>	CB184616	F: GCCATCGTGCTCACCTTTAT R: CTGTTGCCATACCCCATCTT
Inmunoglobulina T	<i>igt</i>	FM145138	F: TGGCAAATTGATGGACAAAA R: CCATCTCCCTGTGGACAGT
Interleucina 1 β	<i>il-1β</i>	AJ277166	F: GGGCTGAACAACAGCACTCTC R: TTAACACTCTCCACCCTCCA
Lisozima	<i>lyz</i>	AM749959	F: CCAGGGCTGGAATCAACTA R: CCAACATCAACACCTGCAAC
Receptor de linfocitos β	<i>tcrβ</i>	AM261210	F: AAGTGCATTGCCAGCTTCTT R: TTGGCGGTCTGACTTCTCTT
Factor de necrosis tumoral α	<i>tnfα</i>	AJ413189	F: TCGTTCAGAGTCTCCTGCAG R: TCGCGCTACTCAGAGTCCATG
β -defensina	<i>β-def</i>	FM158209	F: CCCCAGTCTGAGTGGAGTGT R: AATGAGACACGCAGCACAAG

I.11 Otras técnicas y consideraciones

Fundamentalmente las técnicas anteriormente descritas son las que se han utilizado durante la experimentación y realización de este trabajo. Es posible que se haya realizado alguna otra técnica no descrita en este apartado, debido sobre todo a la realización de colaboraciones con otros grupos de investigación. En esos casos concretos la técnica se recogerá en el correspondiente apartado de ese capítulo experimental. Del mismo modo y junto con las analíticas se recogerán las técnicas que se hayan realizado sobre las materias primas o la composición de los peces.

I.12 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos han sido representados en las gráficas y tablas correspondientes como la media \pm el error estándar (SEM) para cada parámetro medido. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS 19.0. Para calcular la normalidad de los datos previamente se realizó la prueba Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza fue verificada usando la prueba de Levene. Para comparar las medias entre muestras se realizó la prueba T de Student, y para los no normales, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (dichos datos se transformaron previamente). Las diferencias significativas entre grupos o dietas se analizaron mediante Anova factorial (cuando el número de grupos o dietas lo permitía), o alternativamente se realizó la prueba T de Student. Las pruebas Anova conllevaron un análisis post-hoc de Tukey o Games-Howell. Principalmente estas son las pruebas estadísticas realizadas para determinar las diferencias significativas entre ellas, considerando las diferencias estadísticamente significativas al 95% de nivel de confianza ($p \leq 0,05$) en todos los casos. Todas las medias se han realizado por triplicado.

I.13 Bibliografía

- Bayne, C. J., & Levy, S. (1991). Modulation of the Oxidative Burst in Trout Myeloid Cells by Adrenocorticotrophic Hormone and Catecholamines: Mechanisms of Action. *Journal of Leukocyte Biology*, *50*(6), 554–560. <https://doi.org/10.1002/jlb.50.6.554>
- 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), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cámara-Ruiz, M., García-Beltrán, J. M., Cerezo, I. M., Balebona, M. C., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2022). Immunomodulation and skin microbiota perturbations during an episode of chronic stress in gilthead seabream. *Fish & Shellfish Immunology*, *122*, 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.02.011>
- Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (Texto pertinente a efectos del EEE), (2019). <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/2019-06-26/spa>
- Du, Z., & Turchini, G. M. (2021). Are we actually measuring growth?—An appeal to use a more comprehensive growth index system for advancing aquaculture research. *Reviews in Aquaculture*, raq.12604. <https://doi.org/10.1111/raq.12604>
- Esteban, M. A., Mulero, V., Muñoz, J., & Meseguer, J. (1998). Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell and Tissue Research*, *293*(1), 133–141. <https://doi.org/10.1007/s004410051105>
- Friend of the Sea. (2014). *Friend of the Sea Standard. Aqua Marine Criteria and indicators for the Certification of sustainable marine aquaculture*. Friend of the Sea. www.friendofthesea.org
- Friend of the Sea. (2016). *Friend of the Sea Standard. Inland Standards for the certification of land-based aquaculture*. Friend of the Sea. www.friendofthesea.org
- Guardiola, F. A., Cuesta, A., Abellán, E., Meseguer, J., & Esteban, M. A. (2014). Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, *40*(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.018>
- Khansari, A. R., Balasch, J. C., Vallejos-Vidal, E., Parra, D., Reyes-López, F. E., & Tort, L. (2018). Comparative Immune- and Stress-Related Transcript Response Induced by Air Exposure and *Vibrio anguillarum* Bacterin in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Mucosal Surfaces. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00856>

- Khansari, A. R., Balasch, J. C., Vallejos-Vidal, E., Teles, M., Fierro-Castro, C., Tort, L., & Reyes-López, F. E. (2019). Comparative study of stress and immune-related transcript outcomes triggered by *Vibrio anguillarum* bacterin and air exposure stress in liver and spleen of gilthead seabream (*Sparus aurata*), zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, *86*, 436–448. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.063>
- Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, Por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, Pub. L. No. Orden ECC/566/2015, BOE-A-2015-3564 27940 (2015). <https://www.boe.es/eli/es/o/2015/03/20/ecc566>
- Phillips, H. J. (1973). CHAPTER 3—Dye Exclusion Tests for Cell Viability. In P. F. Kruse & M. K. Patterson (Eds.), *Tissue Culture* (pp. 406–408). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-427150-0.50101-7>
- Quade, M. J., & Roth, J. A. (1997). A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *58*(3–4), 239–248. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(97\)00048-2](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(97)00048-2)
- Rodríguez, A., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (2003). Phagocytosis and peroxidase release by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes in response to yeast cells. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, *272*(1), 415–423. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10048>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Skretting. (2022). *Skretting en datos*. Skretting. <https://www.skretting.com/es-es/asi-es-skretting/Skretting-en-datos/>

Este folio ha sido intencionadamente dejado en blanco.

Sección primera

Capítulo II. Materiales y métodos 2. Formulación, fabricación, selección y composición de los piensos experimentales



Salmón atlántico

Salmo salar (Linnaeus, 1758)

Salmo: Latin, salmo, Plinius = salmon (Ref. 45335); salar: From the Latin 'salio' meaning to leap (www.fishbase)

Mercado municipal de Cádiz - 2006 (Foto: A. M. Arias)

Derechos cedidos por M. Arias, www.ictioterm.es

Sección primera:

Materiales y métodos

Capítulo II. Materiales y métodos 2. Formulación, fabricación, selección y composición de los piensos experimentales.

II.1 Diseño y formulación de las dietas experimentales

II.2 Fabricación de las dietas experimentales

II.2.1 Tamizado, filtrado y molienda de las materias primas

II.2.2 Pesado de las materias primas

II.2.3 Mezclado y peletizado de las dietas

II.2.4 Secado de las dietas y pasteurizado

II.2.5 Adición de aditivos: antioxidantes, vitaminas o minerales, etc.

II.2.6 Comprobación de la calidad de los gránulos

II.2.7 Conservación y manipulación de las dietas

II.3 Resultado de la fabricación de las dietas experimentales

II.4 Factores limitantes en la selección de materias primas

II.4.1 Factores limitantes de primer nivel

II.4.2 Factores limitantes de segundo nivel

II.5 Relación de dietas utilizadas durante la experimentación

II.6 Composición de las dietas experimentales

II.7 Selección de las dietas industriales o comerciales

II.8 Experiencias previas realizadas

II.9 Bibliografía

II.1 Diseño y formulación de las dietas experimentales

De manera previa a la experimentación se diseñaron y formularon las dietas que se han utilizado tanto para dorada como para mugílidos, cuya composición se recoge en el apartado [II.5 Composición de las dietas experimentales](#) de este capítulo.

Para su formulación se ha utilizado el método del Cuadrado de Pearson por ser la más sencilla y adecuada para el propósito buscado. También creemos que es el método adecuado dado el reducido número de materias primas utilizadas, y el objetivo perseguido. Por el contrario, para la formulación de dietas comerciales —mucho más complejas en su composición— se necesita de otros métodos de programación, y requieren ineludiblemente del uso de herramientas informáticas.

Siendo el objetivo de este trabajo evaluar el posible uso de los subproductos de la industria cervecera como materias primas en acuicultura —y siendo escasos los trabajos científicos que abordan este aspecto—, se ha partido prácticamente de cero a la hora de realizar la formulación, diseño y fabricación de las dietas ensayadas.

Para abordar este trabajo ha sido fundamental las experiencias previas realizadas por el doctorando, y el análisis de los requerimientos nutricionales extraídos de la bibliografía científica para cada especie —*Chelon labrosus* y *Sparus aurata*—.

II.2 Fabricación de las dietas experimentales

En atención a la naturaleza de las diferentes materias primas se han realizado su recepción, y conservación adecuada, en las instalaciones del Animalario de la Universidad de Murcia.

En general, una vez recibidas de los diferentes proveedores se preservaron de la luz y de la humedad, así como se conservaron a temperatura estable fuera del alcance de fuentes de calor ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Tan solo las levaduras de desecho se conservaron en frío ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).

II.2.1 Tamizado, filtrado y molienda de las materias primas

Dependiendo de la naturaleza de la materia prima (líquida o sólida) se procedió a un tamizado (harinas de pescado), o filtrado (aceite de pescado, levaduras, etc.) para evitar partículas de gran tamaño, u otros restos indeseables que se pudieran introducir en los piensos. Al provenir estas materias primas de subproductos de la industria, se tuvo especial cuidado en evitar restos de cartílagos, espinas, o escamas, o cualquier otro objeto indeseable fruto del proceso industrial. Este tamizado y filtrado que se hizo más por garantizar la seguridad y la inexistencia de elementos reiteramos indeseados. El aceite de pescado presentaba un color, una viscosidad, y el olor característico de este tipo de aceites sin que hubiera restos sólidos en suspensión, o humedad. La harina de pescado si presentaba algún que otro trozo de espinas y cartílagos, y una granulometría irregular con algunos gránulos de gran tamaño (Figura 11). Estas partículas se retiraron mediante tamizado y el resto de las cantidades necesarias de la harina para la fabricación de los piensos se homogeneizó mediante molienda con un molinillo de grano (modelo Zilla, marca Orbit). Con posterioridad al filtrado, cribado, tamizado y molienda las materias primas se conservaron hasta su posterior uso (fabricación) en envases de plástico alimentario, nuevos, limpios y desinfectados con etanol. La conservación se realizó a las temperaturas expresadas anteriormente.



Figura 11: Imagen de una muestra de la harina de pescado de subproductos de la industria transformadora. Autor: Luciano Vílchez Gómez (noviembre 2018)

II.2.2 Pesado de las materias primas

De manera previa a la mezcla y peletización las materias primas se pesaron de acuerdo a las tablas de formulación de cada dieta en una balanza de precisión (Europe 600, Gibertini de error $g \pm 0,01$).

De manera general, todas las materias primas se fueron añadiendo a contenedores plásticos de los utilizados en panadería u hostelería. Las cantidades necesarias de materias primas fueron calculadas para las tasas de ingesta diaria prevista, el número de animales en experimentación por grupo (o dieta), así como la duración en días del experimento. Con un margen de + 20 % que pudiera cubrir cualquier imprevisto, posteriores análisis, etc.

II.2.3 Mezclado y peletizado de las dietas

La fabricación de las dietas se realizó con una peletizadora-mezcladora (KM367 CB, Bomann). Las materias primas estas se mezclaron durante un tiempo suficiente para conseguir una mezcla homogénea (dependiendo de las cantidades de materias primas y su humedad), aproximadamente entre 10 y 15 minutos. Estas masas homogéneas —que constituirían las dietas— se realizaron con la totalidad de los ingredientes de las dietas (Figura 12), y se peletizaron a través de una matriz de extrusión con múltiples orificios de un diámetro de 1 mm (Figura 13). La inclusión de todos los ingredientes en la mezcla al inicio reduce los pasos a realizar, los tiempos de espera, y en general el tiempo total de fabricación del pienso, y por ende de los costes de mano de obra o energía.

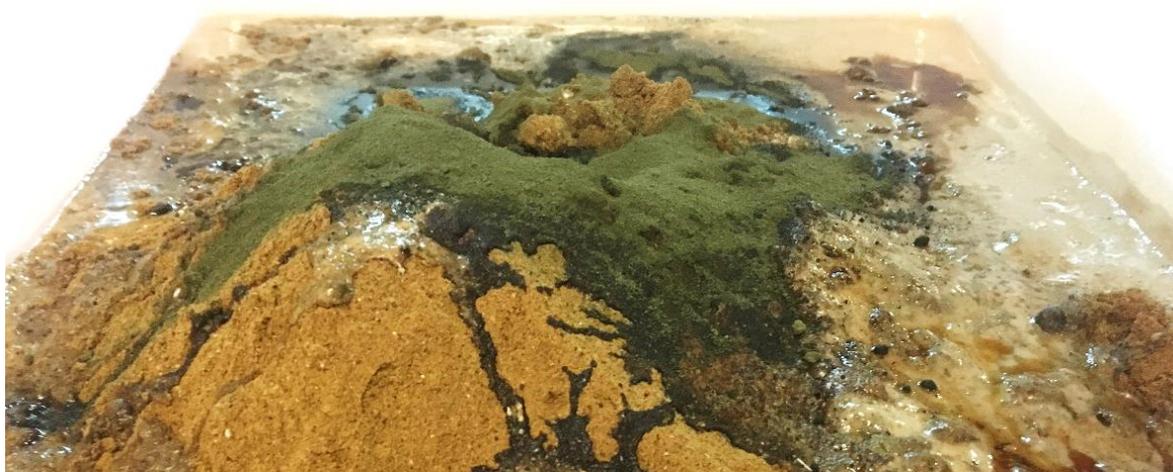


Figura 12: Fotografía de las materias primas de uno de los piensos semi-húmedos fabricados y utilizados en la experimentación, realizada durante el proceso de pesado previo al mezclado. Autor: Luciano Vílchez Gómez (noviembre 2018)



Figura 13: Imagen de la matriz de extrusión múltiple (diámetro 1 mm) utilizada para la fabricación de los gránulos. Autor: El fabricante, Bomann

II.2.4 Secado de las dietas y pasteurizado

Aun, teniendo en cuenta el alto grado de humedad ($< 50\%$) de las diferentes dietas fabricadas —que se pueden considerar semi-húmedas— no se realizó ningún proceso de secado, ni forzado mediante el uso de hornos, secadores, etc., ni tampoco a temperatura ambiente.

La humedad final de los gránulos se controló desde el proceso de mezcla de las materias primas (ya que se conoce la cantidad inicial en cada una de ellas y las cantidades incluidas en cada dieta). Así todo el proceso de fabricación fue realizado para conservar esa cantidad de agua original de las materias primas, sobre todo la de las levaduras de desecho.

Durante el proceso de fabricación de las dietas no se utilizó ningún proceso intensivo en el uso de la energía, así la peletización se realizó en frío, y no se realizó reiteramos un secado forzado, tampoco la adición mediante bombas de vacío de las grasas y aceites, ni tampoco un proceso de pasteurizado para controlar la composición microbiana de los piensos. A diferencia con el proceso de pasterización o pasteurización que si se realiza en los piensos Oregon “*Moist-Pellet*”

II.2.5 Adición de aditivos: antioxidantes, vitaminas o minerales, etc.

Ni a las dietas, ni a las materias primas se le adicionó ningún tipo de aditivo, aglomerante, antioxidantes o pre-mezcla mineral o vitamínica durante todo el proceso de ensilaje o producción. Las dietas están solo compuestas por las materias primas que se relacionan en su composición, y tampoco se han adicionado antioxidantes por ejemplo a la harina, o al aceite de pescado. Diferencia esencial respecto de otras dietas experimentales y/o industriales las cuales en su composición incluyen gran cantidad de aditivos (antioxidantes, minerales, vitamínicos, enzimas, aminoácidos cristalinos, etc.)

II.2.6 Comprobación de la calidad de los gránulos

Con posterioridad a la peletización, se realizó una necesaria inspección ocular y separación manual de aquellos gránulos de pienso o “*pellets*” que estaban aglomerados, o la eliminación de aquellos otros que por el proceso de compactación resultaron de un tamaño mayor al deseado (en función de la talla de los peces objeto de los ensayos). La fabricación de los piensos presentó la dificultad de estar destinados a peces de talla pequeña (o pre-engorde), ya que los gránulos al no realizarse mediante un proceso industrial pueden presentar en su formato final alguna variabilidad en su tamaño. Evitar esta variabilidad es más complejo con los gránulos pequeños (< 2 mm de diámetro) que con los formatos grandes para peces de engorde y de mayor talla (3, 4, 5, u 8 mm).

Para poder comparar entre diferentes piensos experimentales se muestran dos imágenes. La primera (Figura 14) es una fotografía realizada a uno de los piensos semi-húmedos utilizados durante la experimentación de este trabajo. La segunda, (Figura 15) es una fotografía de los piensos realizados en Proyecto LIFE Brewery ([European Commission, 2022](#)), en el que también se utilizan subproductos del sector cervecero. En este Proyecto se fabricaron diferentes piensos secos y de diferente tamaño. En esta imagen, se puede apreciar como hay restos o polvo (que se ha soltado de los gránulos) en la mano operario. Además, se puede apreciar el tamaño y la uniformidad de los “*pellets*” con ayuda de la referencia visual al tamaño de las palmas de las manos de los operarios (Figura 15) ([LIFE Brewery, 2019](#)).

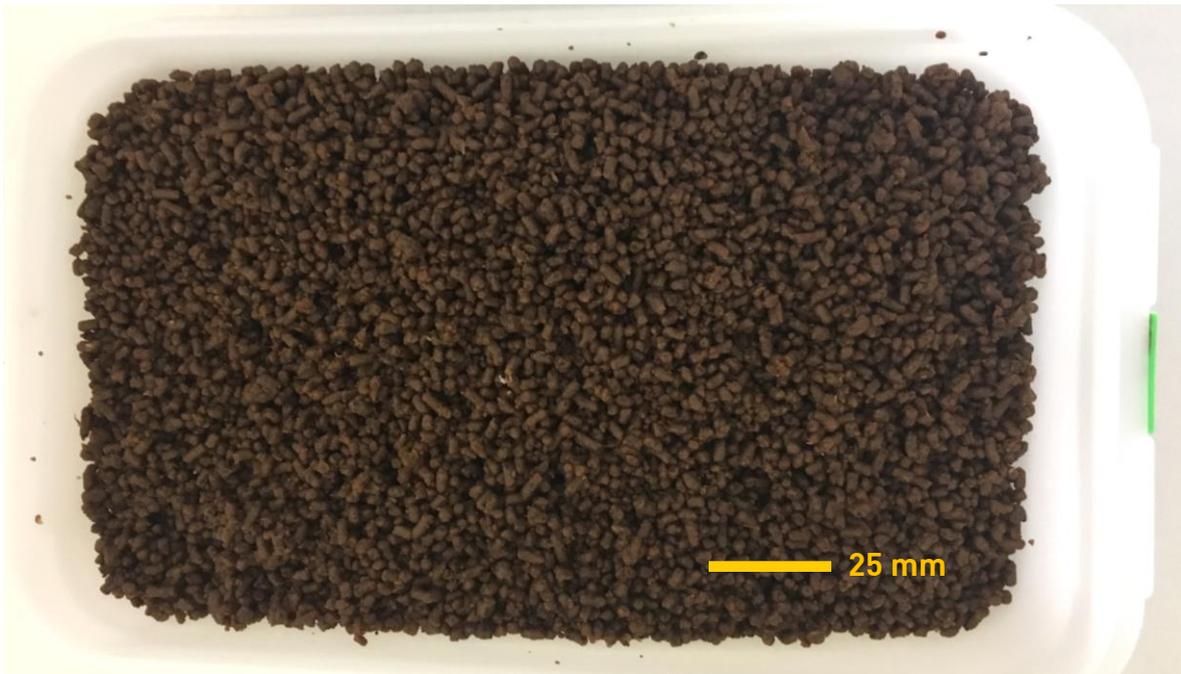


Figura 14: Fotografía de los gránulos de uno de los piensos semi-húmedos fabricados y utilizados en la experimentación, de diámetro del gránulo entre 1 mm y 2 mm. Autor: Luciano Vilchez Gómez (noviembre 2018)



Figura 15: Fotografía de los piensos secos realizados en Proyecto LIFE Brewery para la realización de las pruebas de digestibilidad en el IRTA. Compartida de manera pública en Facebook el 7/3/2019 en el perfil del proyecto.

II.2.7 Conservación y manipulación de las dietas

Todo el proceso de fabricación de las dietas se realizó a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en un ambiente desinfectado y limpio, extremando las condiciones de higiene y manipulación tanto de las dietas como de las materias primas. No se realizó ningún proceso en condiciones de esterilidad.

Con posterioridad a su peletización las dietas se conservaron en contenedores plásticos herméticos, rotulados e independientes a temperatura controlada ($3^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C}$) en un frigorífico dedicado para este uso ubicado en las instalaciones del Animalario de la Universidad de Murcia. Durante todo el tiempo que se realizaron los ensayos se mantuvo se procuró evitar las contaminaciones de las dietas del mismo modo que se hace con cualquier otro pienso experimental o de mantenimiento de los animales estabulados (piensos comerciales de Skretting).

Es necesario exponer que los piensos comerciales ($< 10\%$ de humedad) son hidrófilos por lo que deben conservarse alejados de la humedad. Aspecto este que resulta complicado en una instalación acuícola industrial o de experimentación. Factor que junto al alto contenido de materias vegetales de estos piensos que puede resultar en el crecimiento de hongos patógenos, y en la producción de micotoxinas. En el caso concreto de las dietas experimentales realizadas para esta tesis el problema era justamente el contrario, al ser piensos semi-húmedos. Para evitar la deshidratación y para mantener las ratios de composición de macronutrientes respecto del peso del pienso se conservaron en contenedores herméticos y en frío.

Así, diariamente la ración de cada dieta era pesada con precisión (error $\text{g} \pm 0,01$) en una balanza, y conservada en un pequeño recipiente de plástico numerado por tanque hasta su administración. Este proceso se realizaba sin mayores precauciones que la de hacerlo sobre una superficie limpia, con las manos lavadas y secas, y usando recipientes numerados que diariamente eran lavados con agua y jabón, y secados (para su reutilización los días siguientes).

Dado el alto contenido de levaduras de las dietas las características de las mismas no variaron durante el tiempo de uso y conservación. Así el olor era agradable, similar al del inicio de la fabricación, dulzón, a levadura de cerveza fermentada con ciertos matices fuertes

del olor de la harina y aceite de pescado, no hubo cambios en la coloración, o en la textura de los gránulos, ni se apreció crecimiento de hongos filamentosos o mohos (a simple vista).

Este crecimiento de hongos y mohos es observable a simple vista, aunque se haya realizado un proceso de secado industrial (humedad < 10 %), cuando se dan las siguientes circunstancias: i) las condiciones de humedad del ambiente son altas, ii) los piensos no están en recipientes o contenedores aislados de la humedad ambiental, iii) incluyen en sus formulaciones materias primas vegetales. De ahí que habitualmente las dietas experimentales se mantengan en frío durante su uso y las industriales se recomiende por los fabricantes mantenerlas alejadas de ambientes húmedos y de fuentes de calor.

En este caso, la conservación en frío y en contenedores herméticos de las dietas experimentales utilizadas durante la tesis se realizó más por mantener unas condiciones de higiene, evitar contaminaciones —con otras materias primas, de otros piensos, etc. que pudieran guardarse en el mismo frigorífico durante la experimentación— más que por el motivo de preservar dichas dietas de crecimientos de hongos o mohos. También se mantuvieron en estas condiciones por mantener un grado de humedad constante durante los experimentos que garantizara la ratio de nutrientes por peso de la dieta, ya que una mayor deshidratación incrementaría proporcionalmente la cantidad de proteína, grasas, etc. de la ración diaria suministrada a los animales. Algunas porciones de estas mezclas o piensos experimentales se han conservado sin mantener la cadena de frío y no han aparecido crecimiento de mohos u hongos.

II.3 Resultado de la fabricación de las dietas experimentales

Como resultado del proceso anterior se obtuvieron las dietas experimentales que se evalúan en la sección experimental de este trabajo. Las características de los gránulos del pienso se pueden apreciar en la Imagen 9 previamente mostrada, ya que todas las dietas fabricadas presentan unas características similares. El proceso realizado y descrito permitió obtener gránulos regulares de tamaño, de diámetro entre 1 mm y 2 mm, algo alargados por el proceso de peletización en frío, marrones, y suaves al tacto por el alto contenido de humedad —aunque entre ellos no se aglutinaban, ni desprendían partículas o polvo—.

La total aceptabilidad de las dietas por todas las especies a las que se les ha suministrado es otra característica reseñable de las dietas. Algunas de estas especies no se han utilizado para la experimentación de este trabajo, así, tanto *Chelon labrosus*, *Liza aurata*, *Liza ramada*, *Sparus aurata*, o *Dicentrarchus labrax* aceptaron perfectamente las dietas con alto contenido en levadura (sin que se produjera rechazo). Esta aceptación puede deberse a que el pienso mantenía la estabilidad en el agua, se hundía relativamente despacio y facilitaba a los animales acceder al alimento en la mitad de la columna del agua. Aspecto recientemente confirmado para los mugílidos por [Ramos-Júdez & Duncan, 2022](#). y en el que se profundizará en la necesaria discusión científica sobre las dietas.

Por un lado, otra característica reseñable de los gránulos es que su alto grado de humedad (< 50%) podría limitar su uso en el caso de que se utilicen alimentadores automatizados, o esparcidores con tuberías de aire a presión. Este factor negativo se puede evitar aumentando la presión de compactación de los gránulos. En el caso que nos ocupa, y para esta experimentación no se consideró un factor limitante ya que la alimentación a los peces se le iba a suministrar de manera manual. En el hipotético caso de que se deseara utilizar este tipo de dietas semi-húmedas con alimentadores industriales, sería conveniente realizar una prueba de la resistencia de los gránulos. Este factor de fragmentación o emisión de polvo/partículas puede suponer entre el 1 % - 2 % aproximadamente de desperdicio del peso del pienso suministrado en una granja. Por ello su reducción es deseable, y supone minimizar el desperdicio de pienso por la fricción, roce o fragmentación de los “*pellets*”, que al llegar a los peces en forma de polvo no lo pueden ingerir. Por otro lado, el alto grado de humedad puede considerarse también un factor positivo, al ser los gránulos más suaves, y más parecidos en textura al alimento natural de los peces que una dieta completamente seca.

II.4 Factores limitantes en la selección de materias primas

A la hora de formular dietas experimentales y/o testar nuevas materias primas para la alimentación animal (no solo en acuicultura) hay que tener en cuenta determinados factores limitantes que hemos dividido en dos niveles. Un primer nivel general que es aplicable a la formulación y diseño de piensos de cualquier ganadería, y un segundo nivel más específico de las dietas de acuicultura realizada para esta investigación.

Los factores limitantes de primer nivel son: la cantidad, la homogeneidad (calidad y cualidades nutricionales), y el precio. Los factores limitantes de segundo nivel son: La heterogeneidad de la composición de las harinas de pescado, el alto grado de humedad de los subproductos del sector cervecero, los posibles factores antinutricionales de las materias primas.

Esta división de los factores es más didáctica que práctica, ya que para evaluar una inclusión de una posible nueva materia prima todos estos factores se deben tener en cuenta en conjunto: precio, cantidades disponibles en el mercado, homogeneidad junto con la calidad y composición, así como los posibles factores antinutricionales y/o contaminantes que pudieran estar presentes de manera habitual o incidental. Estos factores limitantes han ayudado a alinear las materias primas seleccionadas en esta investigación con las características de la economía circular. Por lo que en las dietas de este trabajo prima la reutilización de subproductos de industrias (escasamente valorizados) de los que existe gran cantidad en el mercado. Además, se puede considerar que son de bajo precio en el mercado global, y mantienen unas características de calidad homogéneas por lo que serían aptos para su inclusión por cualquier fabricante de piensos con independencia de su localización geográfica.

Tan solo se han utilizado materias primas disponibles en el mercado local, adquiridas a productores españoles primando el criterio de cercanía —a una hipotética planta de producción de pienso (teóricamente localizada en las instalaciones de la Universidad de Murcia donde se han fabricado los piensos)— aunque el criterio principal para su selección ha sido el de la reutilización de subproductos (con un volumen de producción alto y bajo precio), por lo que su reincorporación a un nuevo proceso productivo dota de circularidad material y económica a los piensos fabricados, además de reducir considerablemente el precio de las formulaciones.

II.4.1 Factores limitantes de primer nivel

El primero de estos factores es la cantidad disponible en el mercado de una determinada materia prima. En la ganadería intensiva, y dentro de esta, en la acuicultura, se consume gran cantidad de piensos y por tanto de materias primas. Por esto una formulación experimental tendría poca aplicabilidad práctica si incluyera grandes cantidades de una nueva materia prima —por ejemplo, más de un 10 %— y el mercado global no fuera capaz de suministrarla. Por eso es interesante antes de testar una nueva materia prima con vocación de industrial, que existan productores que puedan suministrarla en cantidad suficiente. O canales de distribución establecidos que pudieran facilitar su compra a los fabricantes de pienso (sin importar su localización).

El segundo es la calidad homogénea en características, requisito imprescindible para estandarizar las formulaciones (al menos en los parámetros básicos de composición de macronutrientes como proteína, grasas, etc.). Lo razonable es que exista una pequeña variabilidad en las composiciones dependiendo de los lotes, y por eso las tablas nutricionales de los alimentos recogen sus valores medios, máximos y mínimos, junto con otras características tales como digestibilidad, etc. (Heuzé et al., 2022; Sauvant et al., 2004; U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service, 2022). Con el objetivo de minimizar esta variabilidad entre la composición de las materias primas y su traslado a la composición de las dietas todas las materias primas que se han utilizado provenían de un mismo lote de compra (por proveedor y materia prima).

El tercer factor es el precio, restricción que es imprescindible tener en cuenta para que las materias primas puedan ser incluidas en las formulaciones. Así cualquier posible ventaja biológica (*v.g.* un mayor crecimiento) se puede ver diluida si el precio de la materia prima incluida excede del de otras materias primas sustitutivas (de similares parámetros de composición y de resultados sobre el crecimiento de su inclusión). Por un lado, y en concreto podemos resaltar que y aunque el precio de las harinas de pescado es muy alto en comparación con otras materias primas (*v.g.* vegetales), su alto valor nutricional, alta digestibilidad, gran contenido de proteína, minerales, etc. aun así las hace preferibles frente a las últimas y las hace difícilmente reemplazables. Por otro lado, cuando la calidad es similar (*v.g.* porcentaje de proteína similar entre dos harinas vegetales, soja, maíz, etc.) los factores determinantes para su inclusión van a ser el precio y su disponibilidad en el mercado.

Estos tres factores limitantes de primer nivel, y reiteramos restrictivos, no se deben dejar a un lado, debiéndose tener en cuenta en todo momento a la hora de formular un pienso experimental. Tampoco debemos olvidar que el fin último de este tipo de investigaciones es el de incrementar el conocimiento sobre la nutrición de las diferentes especies, y generar un salto tecnológico en el sector de los piensos para acuicultura. Por ello, es necesario mantener también entre los objetivos el testar materias primas con serias aspiraciones de ser algún día incluidas en las dietas comerciales.

Así, no son muchas las nuevas materias primas (de las que se prueban experimentalmente) las que finalmente logran ser incluidas de manera habitual por la industria en los piensos comerciales superando estas tres restricciones (cantidad, homogeneidad y precio) y su relación entre ellas (*v.g.* poca producción y escasas disponibilidad junto con un precio excesivo que hace más razonable y económicamente rentable utilizar otras alternativas).

Muchas de estas nuevas materias primas probadas por la industria (*v.g.* como sucede con las microalgas, o la biomasa basada en microorganismos, o las harinas de insectos) al no superar estos límites productivos y económicos (cantidad - precio) quedan limitadas a su uso como aditivos inmunomoduladores, prebióticos, o probióticos, etc. de inclusión reducida en los piensos comerciales (aproximadamente entre un 0,5 % y un 2 %), o se destinan a otros sectores de mayor rentabilidad para el productor y que estén dispuestos a asumir ese alto precio (cosmética, dietas para acuariofilia, producción de nutracéuticos, alimentación humana, etc.)

Aunque estos aspectos se discutirán en profundidad a lo largo del texto es necesario en este momento del trabajo realizar estas puntualizaciones que reiteramos muchas veces son obviadas en la investigación sobre la sustitución de las harinas o aceites de pescado. Y si bien, muchas de las materias primas testadas en las últimas décadas en este rol sustitutivo suponen un gran avance en el conocimiento biológico de las especies en cultivo y en su respuesta sobre todo a materias primas vegetales (principal opción por precio y cantidad) se sabe de antemano que sus opciones de plasmarse en una realidad en dietas comerciales son prácticamente nulas ya que reiteramos las cantidades son insuficientes y los precios exceden por mucho el de otras alternativas.

II.4.2 Factores limitantes de segundo nivel.

Además de los factores de cantidad, calidad y precio (de primer nivel) que resultan restrictivos y obvios a la hora de seleccionar materias primas, este trabajo también ha encontrado dificultad particularmente con otros tres factores que tampoco creemos que se les de la debida importancia cuando se diseñan o producen piensos experimentales.

El primero de estos factores de segundo nivel es la diferencia de propiedades nutricionales entre las harinas de productos pesqueros, y las harinas de subproductos de la industria transformadora. Es conocida la variabilidad y calidad de las harinas de pescado, pero es un factor que se suele obviar en los estudios sobre la sustitución de estas materias primas —siendo el patrón «oro» de la industria ganadera y de la investigación la harina de pescado de alta calidad (de más de un 70 % de proteína, y bajo contenido en cenizas)—. Por eso, cuando hablamos en general de la necesaria sustitución o reemplazo de harinas de pescado, implícitamente estamos buscando una materia prima capaz de reemplazar las costosas y escasas harinas de pescado de más de un 70 % de proteína.

El segundo de estos factores es el alto grado de humedad, aproximadamente un 85 % del peso de dos de las materias primas seleccionadas, las levaduras de desecho y el extracto acuoso de *Ascophyllum nodosum* que han supuesto un reto a la hora de diseñar, formular y seleccionar el proceso de fabricación de los piensos.

El tercer factor que perfectamente podría estar incluido entre los primeros (cantidad, homogeneidad y precio), es la inclusión o no inclusión, de determinadas materias primas (vegetales fundamentalmente) con elementos antinutricionales o características no deseadas. Este factor se incluye en este nivel por ser particular de esta investigación, ya que los vegetales suponen un excelente componente de la nutrición de otras ganaderías y evidentemente de las personas, pero no sucede tanto así respecto de los peces, y sobre todo de las especies carnívoras que se cultivan en el área mediterránea. Además, su inclusión obliga al uso de otras soluciones tecnológicas en la fabricación de los piensos (extrusión, precocinado, extracción química o adición de enzimas, etc.). También algunas de estas posibles materias primas vegetales no son locales (como la soja), y necesitan de su importación, incrementando los costes, así como las emisiones de gases de efecto invernadero. También su sostenibilidad ambiental está más que cuestionada (por el excesivo

uso de agua para su cultivo, la ocupación del suelo y su influencia en la deforestación del Amazonas, etc.). Por eso su posible inclusión alejaba a las dietas fabricadas de los objetivos marcados de incrementar la circularidad valorizando subproductos o residuos, o evitar el uso de aditivos, y de reducir los consumos de energía y agua.

Estos seis factores limitantes de la selección de las materias primas para este trabajo serán debidamente analizados en la correspondiente discusión sobre las dietas.

II.5 Relación de dietas utilizadas durante la experimentación

Durante la experimentación se han utilizado diversas dietas, tanto industriales como experimentales fabricadas para los experimentos. Las dietas realizadas por el fabricante Biothesan son parte de las dietas formuladas y fabricadas por esta empresa propiedad del doctorando dentro del Proyecto [MugilDiet](#), Convocatoria Pleamar, FEMP (2017/2424).

En la Tabla 2: Relación de dietas utilizadas durante la experimentación, se recoge un resumen por capítulos experimentales de las dietas con las que se ha alimentado a los peces, su fabricante, y la especie a la que se le administró:

Tabla 2: Relación de dietas utilizadas durante la experimentación

Cápítulo experimental	Especie	Dieta	Fabricante
Capítulo III	<i>Sparus aurata</i>	Mar Perla L	Skreeting
Capítulo IV	<i>Sparus aurata</i>	Ti3	Skreeting
		Mar Perla L	Skreeting
		B40	Biothesan*
		B70	Biothesan*
Capítulo V	<i>Chelon labrosus</i>	Ti3	Skreeting
		B40	Biothesan*
		B70	Biothesan*
Capítulo VI	<i>Chelon labrosus</i>	Ti3 D4 Optibream	Skreeting Skreeting
Capítulo VII	<i>Chelon labrosus</i>	B70M+	Biothesan*
		B70V+	Biothesan*

* Las dietas fabricadas por Biothesan dentro del Proyecto Mugildiet fueron realizadas íntegramente por el doctorando

II.6 Composición de las dietas experimentales

La composición de las mismas se detalla en este apartado, también en cada capítulo experimental, y en el caso de que se hubieran comparado con dietas industriales se expresarán ambas composiciones.

En la Tabla 3 se recoge la composición en porcentajes de cada una de las dietas utilizadas en la investigación, así como los proveedores de dichas materias primas. Siendo resaltable el alto grado de inclusión de subproductos y reciclado de las dietas, ya que en todas ellas se supera el 84 % de materias primas provenientes de otros procesos, hasta un máximo de un 89 %. Se desconoce si algún otro proyecto o estudio ha logrado alcanzar estos niveles de inclusión. Las dos materias primas que aún no se han podido sustituir por subproductos son el aceite de oliva virgen extra de la Cooperativa Santísimo Cristo de la Misericordia, y el extracto acuoso de *Ascophyllum nodosum* de Tradecorp España, ambos productos provienen de productores con un alto grado de sensibilidad ambiental, aspecto este que se comentará en la debida discusión.

Tabla 3: Formulación y composición (%) de las dietas experimentales

Materias primas	B40	B70	B70T+	B70M+
Harina de pescado de subproductos [58% PB] ⁽¹⁾	25,00	20,00	20,00	20,00
Levadura de desecho ⁽²⁾	55,00	62,50	62,50	62,50
Aceite de pescado de subproductos ⁽¹⁾	6,50	6,50		6,50
Aceite de oliva virgen extra ⁽³⁾			6,50	
<i>Ascophyllum nodosum</i> (extracto 15% MS) ⁽⁴⁾	13,50	11,00	9,50	9,50
Bagazo de desecho ⁽²⁾			1,50	
<i>Nannochloropsis gaditana</i> ⁽⁵⁾				1,50
Total porcentaje de subproductos	86,50	89,00	84,00	89,00
Total porcentaje de la dieta:	100,00	100,00	100,00	100,00

PB: Proteína bruta; MS: Materia Seca

⁽¹⁾ Pescave. Hijos de Emilio Ramírez S.A. (Cantabria, España)

⁽²⁾ Estrella de Levante S.A.U. (Murcia, España) y Cervezas Yakka. Acequia Brewing S.L. (Murcia, España)

⁽³⁾ Cooperativa Santísimo Cristo de la Misericordia (Jódar, Jaén, España)

⁽⁴⁾ PHYLGREEN® Tradecorp España. Trade Corporation International S.A.U (Madrid, España)

⁽⁵⁾ Proyecto SABANA, (grant # 727874- Horizon 2020). Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería (España)

En la Tabla 4 se recoge la composición proximal en porcentaje de las dietas fabricadas para la experimentación y de las dietas seleccionadas como industriales. Las dietas B40 y B70 son similares en composición a las dietas B70T+ y B70M+. Sobre estas dietas se ha calculado la energía bruta (MJ/kg), mientras que sobre las dietas industriales de Skreering Ti3 y D4 se refleja la energía digestible facilitada por el fabricante. Aproximadamente esta energía digestible convertida a bruta sería un 10 % más, sin que el cálculo exacto sea relevante para esta investigación. Del mismo modo el Extracto Libre de Nitrógeno (ELN) de las dietas industriales Ti3, D4 y Mar PL se calcula sobre una humedad aproximada de los piensos secos de un 8 %, o respectivamente un 45,5 %, 20,40 % y 11 %. Esto es relevante para comprobar la similitud entre las dietas formuladas en este trabajo (B40, B70, B70T+ y B70M+) en proteína y grasas con la dieta industrial Ti3 para tilapia, y la gran diferencia con la dieta D4 y Mar PL. Respecto al ELN y a la energía bruta que aporta el ELN en las dietas al reducirse este en las dietas B40 y B70 por la alta inclusión de humedad (43 %) si arroja una diferencia considerable de energía ya que en la dieta Ti3 que podría alcanzar los 22 MJ/kg de energía bruta (si es calculada con los mismos valores utilizados para las dietas B40 y B70). Valores aproximados, pero que no dejan de ser significativos en términos de energía, ya que reiteramos en energía bruta duplicaría la energía de las dietas fabricadas para la experimentación. Y su transformación a energía digestible variará dependiendo de la composición de las materias primas.

Tabla 4: Composición proximal (%) de las dietas experimentales e industriales

	B40	B70	Ti3	D4	Mar PL
Proteína bruta (PB)	28,63	28,60	33,00	46,00	56,00
Grasa bruta (GB)	9,50	8,90	6,50	19,00	15,00
Ceniza bruta (CB)	6,55	6,62	7,00	6,60	10,00
Humedad (H)	43,22	43,78	8,00	8,00	8,00
Extracto libre de nitrógeno* (ELN)	10,60	10,60	45,50	20,40	11,00
Aditivos (microalgas Nanno)	1,50	1,50			
Total porcentaje de la dieta:	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Energía Bruta (MJ/kg) Calculada**	13,06	12,83			
Energía Digestible (MJ/kg)			12,00	18,00	

*Calculado por diferencia (ELN = 1000 - PB - GB - CB - H)

** Proteína 5,65 kcal/g; lípidos 9,45 kcal/g; ELN 5,65 kcal/g

*** Estimada en un 8 % para los piensos secos

En la Tabla 5 se recoge la composición de ácidos grasos de algunas de las materias primas utilizadas. Siendo lo más destacable el alto grado de contenido de ácido oleico del aceite de pescado del aceite de oliva, así como del extracto de *A. nodosum*. Análisis realizados desinteresadamente por Daniel González-Silvera (*Institute of Aquaculture, School of Natural Sciences, University of Stirling, Stirling FK9 4LA, Scotland, UK.*) y de acuerdo a la metodología descrita en (Boutarfa et al., 2022; Christie, 2003; Folch et al., 1957). En la Tabla 6 se recoge la composición en ácidos grasos de algunas de las dietas utilizadas durante la experimentación.

De manera resumida, los ácidos grasos se extrajeron de muestras de tejido de 0,3 a 1,0 g mediante homogeneización en 20 ml de cloroformo/metanol (2:1 v/v) en un homogenizador de tejidos Ultra Turrax (IKA ULTRA-TURRAX T 25 digital, IKA-WERKE). Los lípidos totales se prepararon según el método de Folch et al., (1957) y las impurezas no lipídicas se eliminaron lavando con KCl al 0,88% (p/v). El peso de los lípidos se determinó gravimétricamente después de la evaporación del disolvente y la desecación al vacío durante la noche. Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se prepararon mediante transesterificación catalizada por ácido de lípidos totales según el método de Christie, 2003, y las muestras de lípidos totales se transmetilaron durante la noche en 2 ml de ácido sulfúrico al 1 % en metanol (más 1 ml de tolueno para disolver lípidos neutros) a 50 °C. Los ésteres metílicos se extrajeron dos veces en 5 ml de hexano-éter dietílico (1:1, v/v) después de la neutralización con 2 ml de KHCO₃ al 2 %, se secaron bajo nitrógeno y se redisolviaron en 0,1 ml de isohexano. Los FAME se separaron y cuantificaron mediante cromatografía gas-líquido utilizando una columna capilar de sílice fundida flexible SPTM 2560 (100 m de largo, diámetro interno de 0,25 mm y espesor de película de 0,20 mm; SUPELCO) en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890. La temperatura del horno del cromatógrafo de gases se programó durante 5 min a una temperatura inicial de 140 °C, y se incrementó a razón de 3 °C/min hasta 230 °C, luego se aumentó a razón de 2 °C/min hasta 240 °C y luego se mantuvo a esa temperatura durante 12 min. El inyector y el detector de ionización de llama se ajustaron a 260 °C. Se usó helio como gas portador a una presión de 300 kPa, y los picos se identificaron comparando sus tiempos de retención con los estándares FAME apropiados adquiridos de Sigma Chemical Company (St Louis, MO, EE. UU.). Las concentraciones de ácidos grasos individuales se expresaron como porcentajes del contenido total.

Análisis bioeconómico de la valorización de subproductos de la industria cervecera en dietas funcionales para una acuicultura sostenible

Tabla 5: Composición de ácidos grasos de algunas de las materias primas utilizadas

Tabla 6: Composición de ácidos grasos de algunas de las dietas utilizadas

	AP ^[1]	AOVE ^[2]	HP ^[1]	Nanno ^[3]	PhylG ^[4]		B40	B70	B70M+	D4.Optibream	Ti3
10:0	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,09	0,00	0,00	10:0	0,17	0,27	0,23	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
12:0	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00	0,00	0,00	12:0	0,10	0,10	0,17	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
14:0	3,45 ±0,30	0,00 ±0,00	4,88	0,89	9,21	14:0	3,37	3,24	3,41	2,60 ±0,05	1,82 ±0,32
15:0	0,46 ±0,04	0,00 ±0,00	1,15	0,20	0,25	15:0	0,57	0,53	0,54	0,21 ±0,01	0,17 ±0,02
16:0	14,50 ±1,30	11,95 ±2,14	25,58	20,53	10,22	16:0	18,07	17,72	17,43	14,06 ±1,31	19,26 ±0,02
18:0	3,81 ±0,36	2,62 ±0,56	8,23	0,35	0,88	18:0	5,32	5,22	5,17	4,14 ±0,37	5,01 ±0,06
20:0	0,28 ±0,03	0,30 ±0,06	0,49	0,00	0,26	20:0	0,31	0,30	0,31	0,63 ±0,06	0,49 ±0,01
22:0	0,48 ±0,35	0,08 ±0,01	0,30	0,12	0,18	22:0	0,18	0,18	0,19	0,89 ±0,07	0,42 ±0,02
24:0	0,39 ±0,32	0,00 ±0,00	0,21	0,40	0,17	24:0	0,14	0,13	0,14	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
Total saturados	23,37 ±2,70	14,95 ±2,78	40,93	22,48	21,17	Total saturados	28,24	27,69	27,59	22,52 ±1,87	27,18 ±0,26
14:1n-5	0,01 ±0,00	0,00 ±0,00	0,03	0,00	0,24	14:1n-5	0,06	0,07	0,05	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
15:1n-5	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,01	0,03	0,00	15:1n-5	0,00	0,00	0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
16:1n-7	4,03 ±0,35	1,58 ±0,16	6,18	0,85	1,34	16:1n-7	6,06	6,56	5,62	2,79 ±0,08	2,86 ±0,27
18:1n-9	33,45 ±2,96	72,61 ±1,20	0,00	2,01	45,85	18:1n-9	26,89	26,84	27,84	34,97 ±0,83	31,92 ±0,89
18:1n-7	3,49 ±0,31	3,68 ±0,36	6,39	16,97	0,56	18:1n-7	2,93	2,81	3,03	2,84 ±0,09	2,40 ±0,03
20:1n-9	3,16 ±0,29	0,21 ±0,00	5,98	0,12	0,11	20:1n-9	2,33	2,31	2,32	1,88 ±0,08	0,80 ±0,04
22:1n-9	0,35 ±0,06	0,00 ±0,00	0,74	0,00	0,00	22:1n-9	0,34	0,33	0,34	0,23 ±0,01	0,14 ±0,01
24:1n-9	3,27 ±2,81	0,00 ±0,00	1,40	0,00	0,00	24:1n-9	0,55	0,52	0,54	0,27 ±0,00	0,24 ±0,04
Total monoinsaturados	47,76 ±6,66	78,09 ±1,72	20,73	19,98	48,10	Total monoinsaturados	39,17	39,44	39,74	42,97 ±1,09	38,35 ±0,58
18:2n-6	11,20 ±1,00	6,15 ±0,94	9,00	21,62	8,88	18:2n-6	7,76	7,92	8,18	17,73 ±0,29	23,99 ±0,71
18:3n-6	0,26 ±0,03	0,00 ±0,00	0,58	0,26	0,50	18:3n-6	0,19	0,19	0,20	0,09 ±0,00	0,10 ±0,01
20:2n-6	0,35 ±0,35	0,00 ±0,00	0,70	0,00	0,00	20:2n-6	0,55	0,55	0,56	0,10 ±0,00	0,03 ±0,02
20:3n-6	0,20 ±0,05	0,00 ±0,00	0,26	0,00	0,86	20:3n-6	0,21	0,21	0,22	0,09 ±0,01	0,28 ±0,17
20:4n-6	0,57 ±0,25	0,01 ±0,01	2,05	0,00	11,97	20:4n-6	1,15	1,08	1,15	0,31 ±0,01	0,67 ±0,03
22:2n-6	0,30 ±0,30	0,00 ±0,00	0,56	0,00	0,20	22:2n-6	0,47	0,47	0,45	0,35 ±0,01	0,10 ±0,05
22:4n-6	0,35 ±0,21	0,00 ±0,00	0,35	0,00	0,13	22:4n-6	0,13	0,13	0,12	0,04 ±0,00	0,09 ±0,01
Total n-6 PUFA	13,23 ±0,28	6,16 ±0,93	13,50	21,88	22,55	Total n-6 PUFA	10,45	10,55	10,88	18,70 ±0,33	25,26 ±0,72
18:3n-3	3,48 ±0,30	0,80 ±0,13	2,25	35,45	2,29	18:3n-3	2,41	2,42	2,42	5,07 ±0,14	4,44 ±0,17
18:4n-3	0,49 ±0,49	0,00 ±0,00	0,71	0,00	1,44	18:4n-3	0,76	0,77	0,78	0,31 ±0,02	0,16 ±0,01
20:3n-3	0,38 ±0,12	0,00 ±0,00	0,28	0,00	0,26	20:3n-3	0,24	0,22	0,24	0,13 ±0,01	0,01 ±0,01
20:5n-3 (EPA)	2,58 ±2,49	0,00 ±0,00	4,29	0,20	4,18	20:5n-3 (EPA)	4,34	4,40	4,37	5,05 ±0,14	2,34 ±0,66
22:5n-3	0,69 ±0,52	0,00 ±0,00	1,27	0,00	0,00	22:5n-3	0,95	0,97	0,96	0,57 ±0,02	0,26 ±0,06
22:6n-3 (DHA)	8,02 ±6,56	0,00 ±0,00	16,13	0,00	0,00	22:6n-3 (DHA)	13,72	13,92	13,42	4,68 ±0,15	2,01 ±0,46
Total n-3 PUFA	15,64 ±9,64	0,80 ±0,13	24,93	35,65	8,18	Total n-3 PUFA	22,41	22,69	22,18	15,81 ±0,49	9,22 ±1,03
Total PUFA	28,87 ±9,36	6,96 ±1,05	38,43	57,53	30,73	Total PUFA	32,86	33,24	33,06	34,51 ±0,81	34,47 ±0,32
n-3/n-6	1,20 ±0,75	0,13 ±0,00	1,85	1,63	0,36	n-3/n-6	2,14	2,15	2,04	0,84 ±0,01	0,37 ±0,05
TL	81,07 ±1,76	79,02 ±3,73	6,82	14,26	2,31	TL	9,39	8,90	9,15	15,63 ±0,15	5,84 ±0,39

AP: Aceite de pescado; HP: Harina de pescado; AOVE: Aceite de oliva virgen extra; Nanno: *Nannochloropsis gaditana*; PhylG: Phylgreen®

Quando en los valores aparecen 0,00 se entiende no detectado. Valores expresados en g/100 g de tejido peso humedo. Valores promedio ± error estandar (cuando esta disponible)

Cuando en los valores aparecen 0,00 se entiende no detectado. Valores expresados en g/100 g de tejido peso humedo. Valores promedio ± error estandar (cuando esta disponible)

^[1] Pescave. Hijos de Emilio Ramirez S.A. (Cantabria, España)

^[2] Cooperativa Santísimo Cristo de la Misericordia (Jódar, Jaén, España)

^[3] Proyecto SABANA, [grant # 727874- Horizon 2020]. Departamento de Ingeniería Química, UAL [España]

^[4] PHYLGREEN® Tradecorp España. Trade Corporation International S.A.U (Madrid, España)

II.7. Selección de las dietas industriales o comerciales

Aunque tradicionalmente en los trabajos sobre nutrición en acuicultura se recoge la denominación de las dietas compradas a un fabricante como comerciales, en este texto, aunque a veces se intercambiaran los conceptos (industrial y comercial) se prefiere por mucho el término industrial. Primero el término industrial recoge la existencia de un sector dedicado a la fabricación de piensos para diferentes especies de ganaderías incluida la acuicultura. Segundo recoge un *know-how* amplio sobre la nutrición, inmunología y sobre la salud de las especies que cultivamos como alimento o nuestras mascotas (piensos y comida para perros, gatos, caballos, etc.) práctico y aplicado todos los días, tanto en el asesoramiento a los granjeros y productores como a veces a los investigadores con los que sería deseable un mayor trabajo en conjunto. Tercero implica que los piensos se realizan en unas instalaciones costosas con unos parámetros de calidad y seguridad, trazabilidad, etc. difícil de alcanzar por los piensos tradicionalmente hechos en la granja (*farm-made*), o por los piensos que se hacen para la investigación que se realiza en Universidades o centros tecnológicos (donde existe una limitación considerable de recursos materiales para la fabricación de piensos con los estándares industriales).

Dentro de lo posible, y durante la realización de este trabajo se ha procurado mantener unos estándares de control y calidad de la misma manera que si una empresa de producción de piensos de mayor tamaño se tratara. Por ejemplo, en el control estricto sobre la calidad y almacenaje de los lotes de materias primas, en estandarización de los procesos de producción de todas las dietas realizadas para este y otros trabajos, en las limpiezas y desinfecciones, etc.

Por estos motivos, se consideró conveniente incluir en los experimentos realizados dietas industriales de un proveedor reiteramos de prestigio en el mercado de la alimentación animal. Si bien Skreeting se dedica al sector de la acuicultura, otras compañías del grupo se dedican a la alimentación para todo tipo de ganaderías, y cuenta con presencia a nivel mundial.

Aunque comercialmente en el mercado europeo (o asiático) no existe ninguna dieta específica para mugílidos, se consideró el uso de otras diferentes alternativas, como realizar también la fabricación de las dietas control como se hizo en Vilchez-Gomez, 2017.

Finalmente, por ajustarse más a la composición nutricional que requiere la especie, y por ser el tipo de dieta que se utiliza en países como Egipto se seleccionó la dieta T13 de Skreeting. Así, en los lugares donde se cultivan los mójoles en policultivo (junto con otras especies como la carpa, las tilapias, o los camarones) los piensos que se les suministra a todas las especies del estanque es la destinada para la especie prioritaria económicamente dentro del ciclo de cultivo. Normalmente, estas especies se siembran en los estanques en una ratio diferente en el que los mójoles casi siempre son la especie accesoria. Si tenemos en cuenta los datos de producción de Egipto la ratio de producción es de 11 kilos de producción de tilapia frente a 3 kilos de mugílicos, y aunque esto no implica el volumen de siembra — el cual puede ser muy variable entre granjas— si nos orienta un poco en cuanto a la importancia comercial de cada especie. Igual sucede con los policultivos de carpa y mugílicos en Israel, o de camarones y mugílicos en Centro América y Asia.

Las dietas D4 Optibream Y Mar Perla se seleccionaron por ser de las dietas (o líneas de piensos) más utilizada en el arco mediterráneo para la producción de dorada, de manera similar sucede con la línea de Skreeting para lubina.

Otro factor importante a tener en cuenta cuando hablamos de la fabricación de piensos es que, las compañías del sector—al menos en nuestro país sucede con total normalidad— prestan también al productor o ganadero el asesoramiento veterinario necesario para gestionar la instalación o realizar la prescripción por ejemplo de antibióticos o antiparasitarios frente a episodios de enfermedad. Y estas compañías no solo producen piensos normales, también la producción de piensos medicamentosos recae en su esfera comercial (y de conocimiento). Del mismo modo, también producen diferentes líneas de piensos con diferentes aditivos (pre-, pro o simbióticos) para determinadas fases de los cultivos, situaciones de estrés, etc. Esto es un hecho que no es habitualmente conocida por los ajenos al sector de la ganadería (no solo en acuicultura), y que permite a estas empresas incrementar el conocimiento que tiene tanto en el día a día normal de una granja como en los momentos difíciles en los que se surgen episodios de enfermedades bacterianas, víricas, parasitarias, etc. Enfermedades que cada vez se combaten más con estrategias alternativas basadas en la fitoterapia preventiva (García Beltrán et al., 2019, 2020; García de la Banda et al., 2011) por ejemplo frente a las tradicionales estrategias basadas en por ejemplo los antibióticos o antiparasitarios y desinfectantes.

Este factor de gran conocimiento por parte de estas empresas tanto de la biología nutricional de las especies, como de la sanitaria también ha influido en la selección de las dietas control utilizadas en esta experimentación, y que entendemos que son formuladas equilibrando el contenido nutricional con el mantenimiento de la salud de los animales. Del mismo modo que se anima a otros investigadores a utilizar siempre que se pueda y en todos los experimentos a realizar (independientemente del número de dietas de su experimentación) al menos una dieta industrial de referencia para el sector y la especie de estudio. Factor que no siempre es posible por las limitaciones físicas de las instalaciones que limitan y mucho el número de dietas a evaluar y el número de réplicas entre tratamientos.

II.8 Experiencias previas realizadas

Con anterioridad a este trabajo el doctorando ha participado en otros proyectos de investigación relacionados con el cultivo de microalgas hipersalinas en salinas continentales para usarlas como alimentación en acuicultura, Proyecto Ecodunaliella (Fernández-Pérez & Vilchez-Gomez, 2018; González & Vilchez-Gomez, 2016), o también en otros trabajos relativos al aprovechamiento de los subproductos del sector cervecero (Proyecto RETOS COLABORACIÓN (RTC-2014-2353-2) Desarrollo de piensos para peces marinos enriquecidos a partir de subproductos de la empresa cervecera con Estrella de Levante. En este último que fundamentalmente se evaluó las capacidades de los subproductos del sector cervecero para la alimentación de carnívoros como la dorada (*S. aurata*), y se lograron inclusiones máximas de un 20 % de levaduras de desecho (Esteban et al., 2015).

Posteriormente y fruto del proceso formativo del doctorado, así como de su trabajo final de Master (Vilchez-Gomez, 2017) se alcanzaron inclusiones de levaduras de hasta un 65 %. Aunque las dietas resultaron algo desbalanceadas en cuanto a los niveles incluidos de grasas (se evaluaron dos dietas con unos niveles de 1,90 % y 16,30 % de grasas sobre peso húmedo), y la corta duración de la experimentación (30 días) hizo necesario continuar con el trabajo de investigación sobre estas prometedoras materias primas, sobre todo las levaduras de desecho.

Finalmente, el doctorando participó en la solicitud, ejecución y justificación del Proyecto *MugilDiet*, Convocatoria Pleamar, FEMP (2017/2424) en el que se evaluaron además de parte de las dietas formuladas para el proyecto y esta tesis, otras dietas para *Chelon aurata* y *Chelon ramada*, evaluadas en la Universidad de Cádiz. (Vilchez-Gomez,

Piñera, et al., 2019). Proyecto que contó con una jornada final de transferencia de resultados entre Universidad-Empresa realizada en CTAQUA, Centro Tecnológico de la Acuicultura de Andalucía.

También durante el proceso formativo del doctorando se ha participado en diferentes trabajos sobre otras materias primas como los subproductos de la producción de aceite, (Guardiola et al., 2015). En numerosos congresos mediante presentaciones orales de los resultados de la investigación llevada a cabo estos años tanto en la parte biológica como en la económica (o de sostenibilidad de los cultivos), así como en trabajos más concretos sobre la respuesta inmunitaria de especies tan poco conocidas en este aspecto como la anguila europea (Conforto et al., 2021; Cuesta et al., 2018; Espinosa Ruiz et al., 2017; Fernández-Pérez & Vilchez-Gomez, 2017; Guardiola et al., 2019a, 2019b; Piñera et al., 2019; Vilchez-Gomez, Ceballos, et al., 2019; Vilchez-Gomez et al., 2018; Vilchez-Gomez & Fernández-Pérez, 2018)

II.9 Bibliografía

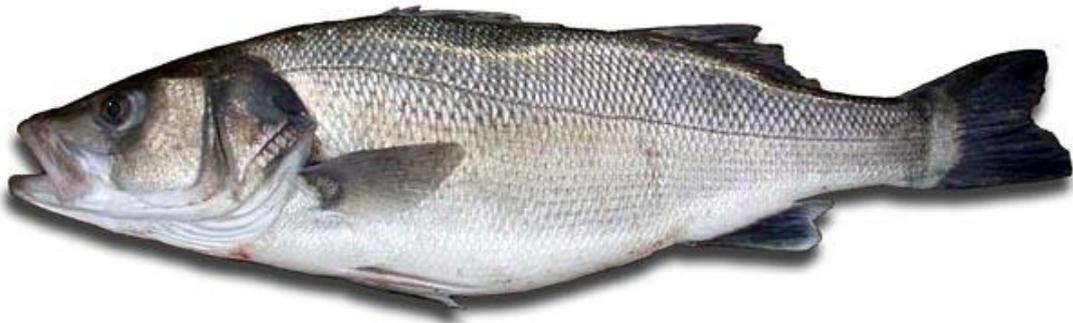
- Boutarfa, S., Senoussi, M. M., González-Silvera, D., López-Jiménez, J. Á., & Aboal, M. (2022). Fatty acids profile of *Mastigocladus laminosus* Cohn ex Kichner isolated from Algerian hot springs as a biofuel feedstock. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 102373. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102373>
- Christie, W. W. (2003). *Lipid analysis: Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids* (3. ed). Oily Press [u.a.].
- Conforto, E., Vilchez-Gomez, L., Parrinello, D., Parisi, M. G., Esteban, M. Á., Cammarata, M., & Guardiola, F. A. (2021). Role of mucosal immune response and histopathological study in European eel (*Anguilla anguilla* L.) intraperitoneal challenged by *Vibrio anguillarum* or *Tenacibaculum soleae*. *Fish & Shellfish Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.05.011>
- Cuesta, A., Ceballos, D., Castillo, Y., Rosa, F., Vasquez, W., Vilchez-Gomez, L., & Esteban, M. (2018). *Bactericidal and immunoestimulant effect of guava (Psidium guajava L.) against Vibrio Harveyi in an hybrid of Oreochromis niloticus and Oreochromis mossambicus*.
- Espinosa Ruiz, C., Vilchez-Gomez, L., Messina, C., & Esteban, M. (2017). *Efecto del té de roca (Jasonia glutinosa) en el sistema inmune de Sparus aurata L.*
- Esteban, M., Martínez, S., Morcillo, P., Guardiola, F., López, J., & Vilchez-Gomez, L. (2015). *Use of by-products of the brewing industry as alternative protein and lipid sources in gilthead seabream (Sparus aurata L.) diets*.
- European Commission. (2022). *LIFE-Brewery. New Strategies for Improving the Sustainability of Breweries: Full Waste Recovery for Aquaculture Feed*. LIFE16 ENV/ES/000160. LIFE Projects Public Database. <https://bit.ly/3QFmPXo>
- Fernández-Pérez, V., & Vilchez-Gomez, L. (2017). *El cultivo de mugílidos en zonas de especial protección ambiental en la Península Ibérica como vía de recuperación económica de humedales y salinas*.
- Fernández-Pérez, V., & Vilchez-Gomez, L. (2018). *Proyecto Ecodunaliella: Biotecnología compatible con el uso tradicional de las salinas andaluzas*.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- García Beltrán, J. M., Espinosa, C., Guardiola, F. A., Manuguerra, S., Santulli, A., Messina, C. M., & Esteban, M. Á. (2019). Effects of dietary dehydrated lemon peel on some biochemical markers related to general metabolism, welfare and stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, are.14272. <https://doi.org/10.1111/are.14272>

- García Beltrán, J. M., Silvera, D. G., Ruiz, C. E., Campo, V., Chupani, L., Faggio, C., & Esteban, M. Á. (2020). Effects of dietary *Origanum vulgare* on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) immune and antioxidant status. *Fish & Shellfish Immunology*, *99*, 452–461. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.040>
- García de la Banda, I., Lobo, C., Chabrellón, M., León-Rubio, J., Arijo, S., Pazos, G., Lucas, L., & Morinigo, M. (2011). Influence of dietary administration of a probiotic strain *Shewanella putrefaciens* on senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) growth, body composition and resistance to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture Research*, *43*, 662–669. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02871.x>
- González, C., & Vilchez-Gomez, L. (2016). *Ecodunaliella: Estudio técnico y económico de la producción primaria como nueva vía para el desarrollo mediante actividades compatibles con el uso tradicional de las salinas andaluzas*.
- Guardiola, F., Conforto, E., Vilchez-Gomez, L., Esteban, M., & Cammarata, M. (2019a). *Evaluación de la respuesta inmunitaria en el moco de la piel de la anguila europea (Anguilla anguilla L.) desafiada con Vibrio anguillarum y Tenacibaculum soleae*.
- Guardiola, F., Conforto, E., Vilchez-Gomez, L., Esteban, M., & Cammarata, M. (2019b). *Histopathological study in the European eel (Anguilla anguilla L.) challenged with Vibrio anguillarum and Tenacibaculum soleae*.
- Guardiola, F., Cuesta, A., Messeguer, J., López, J., Vilchez-Gomez, L., & Esteban, M. (2015). *Effects of dietary administration of olive milling on growth rate, cellular immune activity and antioxidant potential of gilthead seabream (Sparus aurata L.)*.
- Heuzé, V., Tran, G., Bastianelli, D., Archimede, H., & Sauvant, D. (2022). *Feedipedia: An open access international encyclopedia on feed resources for farm animals. A programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. Animal Feed Resources Information System*. Feedipedia. <https://www.feedipedia.org/>
- LIFE Brewery. (2019, July 3). *Fotografía de los piensos realizados en Proyecto LIFE Brewery para la realización de las pruebas de digestibilidad en el IRTA. Compartida de manera pública en Facebook el 7/3/2019 en el perfil del proyecto @LIFE Brewery*. <https://bit.ly/3zUUHsu>
- Piñera, R., Vilchez-Gomez, L., Ceballos, D., Guardiola, F., & Esteban, M. (2019). *Histological effects of two brewery by-products based diets in mullet (Chelon labrosus) liver*.
- Ramos-Júdez, S., & Duncan, N. (2022). Feeding habits and the influence of pellet diameter on the feeding responses of the flathead grey mullet (*Mugil cephalus*) in captivity. *Animal Feed Science and Technology*, *290*, 115368. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115368>

- Sauvant, D., Perez, J.-M., & Tran, G. (Eds.). (2004). *Tables of composition and nutritional value of feed materials: Pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses and fish* (A. Ponter, Trans.). Wageningen Academic Publishers. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-668-7>
- U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service. (2022). *FoodData Central*. Food Data Central. <https://fdc.nal.usda.gov/index.html>
- Vilchez-Gomez, L. (2017). *Evaluación de dietas en mugílicos. Trabajo fin de Máster*. [Master Thesis Máster Universitario en Gestión de Recursos Pesqueros y Acuicultura. Facultad de Biología.]. Universidad de Murcia.
- Vilchez-Gomez, L., Calderón, J. A., Mancera, J. M., & Esteban, M. (2018). *Design and evaluation of diets for a sustainable aquaculture of mugilidae (Mugildiet)*.
- Vilchez-Gomez, L., Ceballos, D., Guardiola, F., Gonzalez Silvera, D., Piñera, R., Calderón, J. A., Mancera, J. M., & Esteban, M. (2019). *Efecto de la sustitución de harina de pescado por levadura de desecho en el sistema inmunitario de Chelon labrosus*. Video available at <https://vimeo.com/337946138>.
- Vilchez-Gomez, L., & Fernández-Pérez, V. (2018). *Sustainable aquaculture growth through assessment of a dynamic matrix of non-subjective indicators*.
- Vilchez-Gomez, L., Piñera, R., Ceballos, D., Guardiola, F., Calderón, J. A., Mancera, J. M., Fernández-Pérez, V., Page, R. B., & Esteban, M. (2019). *Proyecto Mugildiet: El cultivo de mugílicos como opción de futuro para una acuicultura sostenible a nivel global*.

Sección segunda

Capítulo III. Crecimiento de la dorada (*Sparus aurata*) bajo tasas de alimentación óptima y deficientes



Lubina

Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758)

griego *labrax* 'lobo marino' (Barriuso, 1986)

Corrales de Rota, 2002 (Foto: A. M. Arias)

Derechos cedidos por M. Arias. www.ictioterm.es

Sección segunda:

Evaluación biológica de la valorización de los subproductos de la industria cervecera en piensos para acuicultura

Capítulo III. Crecimiento de la dorada (*Sparus aurata*) bajo tasas de alimentación óptima y deficientes

III.1 Resumen y objetivos

III.2 Materiales y métodos

III.2.1 Peces

III.2.2 Dietas

III.2.2.1 Inclusión de la humedad en las dietas

III.2.3 Diseño experimental

IV.2.4 Análisis estadístico

III.3 Resultados y discusión

III.3.1 Comportamiento, canibalismo y mortalidad

III.3.2 Crecimiento

III.3.3 La dispersión de tallas en acuicultura

IV. 4 Bibliografía

III.1 Resumen y objetivos

El objetivo principal del presente estudio fue evaluar el crecimiento de la dorada (*S. aurata*) alimentada con dietas formuladas adecuadamente para esta especie, pero administradas de manera óptima o de manera deficiente (50 % menos), sin modificar el peso total de la ingesta ofrecida a los peces durante tres meses.

Así, el diseño experimental conlleva una reducción porcentual de la cantidad nutricional de la alimentación en un 50 % exacto, y no altera el porcentaje relativo de inclusión de los macronutrientes (MN) (proteína, grasas, carbohidratos, etc.), ni de los micronutrientes (mN) (vitaminas, minerales, etc.) que también proporcionalmente se reducen en la misma medida (un 50 %).

Es habitual que en los experimentos de nutrición al modificar —reducir o aumentar— la cantidad de inclusión MN, o materias primas, etc. en los piensos inevitablemente se modifiquen en diferente proporción el resto de MN. Siendo necesario complementar la dieta por medio de la inclusión de nuevas materias primas que suplan (en el caso de reducciones) el espacio dejado en la formulación por ese macronutriente —o materia prima— que se ha suprimido, adicionando al resto de dietas otras grasas, aminoácidos, etc. Por el contrario, en el caso de los incrementos de MN o materias primas, el formulador de la dieta se verá obligado a reducir los demás hasta que logren compensar su nivel de inclusión en la dieta.

Así, una dieta está conformada por la suma de materias primas o ingredientes que al formulador de la misma le parecen adecuados para cubrir las necesidades energéticas y nutricionales de los animales en crianza. De tal modo que la suma total de macronutrientes o micronutrientes de una dieta (g/kg) es la suma de la composición proximal de cada una de las materias primas por su contenido en MN y mN (g/kg). Más la correspondiente parte proporcional de humedad de cada materia prima.

Si pensamos por ejemplo en un experimento que proponga la reducción de proteína en una dieta para alevines de dorada (*S. aurata*) de un 56 % a un 40 %, es necesario para reducir ese porcentaje del 16 % en proteína reducir la materia prima que lo aporta. Por ejemplo, si el 56 % de proteína de la dieta es aportado vía 777 g/kg de harina de pescado de un 72 % de Proteína Bruta, sobre Materia Seca (MS), para lograr esa reducción la harina de pescado debería reducirse proporcionalmente en 222 g/kg sobre MS afectando a otros

niveles de ingredientes que deben suplementar o rellenar el hueco dejado por esos 222 g/kg. Y esto modifica el resto de niveles de MN y mN de manera ineludible. Así, la harina de pescado no solo aporta proteína y amino ácidos de alta calidad, sino que también aporta un pequeño porcentaje de grasas (aproximadamente un 10 – 12 %) y de cenizas (que pueden llegar hasta un 23 % de la composición), y aporta también minerales, vitaminas, humedad, etc. Por lo que en este ejemplo directamente hemos reducido los niveles de grasas de la dieta total teóricamente propuesta y sin pretenderlo —de manera ineludible reiteramos—, en aproximadamente entre 44 y 48 g/kg frente a la dieta Control.

Sin, que hasta el momento exista ninguna metodología en la literatura científica que permita reducir esos niveles de proteína (del 56% al 40 %) alterando lo menor posible el resto de la composición de la dieta, y sin modificar el comportamiento de los animales por someterlos a una ingesta reducida.

Esto sin duda puede distorsionar los resultados de cualquier experimento. Ya que literalmente al ajustar la dietas al nivel de proteína deseado otras materias primas deben cubrir el espacio dejado, y tradicionalmente las dietas en las que se sustituye esta harina de pescado obliga a incluir niveles mayores de grasas de otro tipo para igualar los niveles de grasa de la dieta control y que la harina de pescado deja de aportar (véase cualquier experimento de sustitución de harina de pescado de los publicados en cualquier revista, y el ejemplo que se presenta en este texto, *vide infra*). Normalmente esta reducción de grasas aparejada a un determinado nivel de harina de pescado se corrige incrementando la inclusión de aceite de pescado en el resto de las dietas. O, en cualquier supuesto imaginable, con otro tipo de materias primas o de MN hacer este tipo de ajustes es inevitable, ya que todas las materias primas que actualmente se usan en piensos compuestos son matrices complejas que no solo aportan proteína, también aportan grasas, minerales, vitaminas, humedad, etc.

El sesgo inevitable que se quiere reducir con la metodología propuesta es el que se produce cuando parte de la proteína y las grasas de las dietas se sustituye por otras materias primas, fundamentalmente carbohidratos de escaso valor nutricional para los peces. Ya que la inclusión de estos carbohidratos que son utilizados para suplir los niveles de proteína o grasas que se han reducido en las dietas, aunque en general tienen en general un bajo valor nutricional no por ello dejan de aportar nutrientes a la dieta y energía, y dependiendo de la especie y su nivel trófico este valor va a ser diferente. (Buhler & Halver, 1961; Cowey et al.,

1985; Cowey & Cho, 1993; Craig & Helfrich, 2002; Gatlin, 2003; Halver & Hardy, 2002). Además esta inclusión de fuentes de carbohidratos puede suponer la inclusión de un factor antinutricional que altere la salud de los peces (Castillo & Gatlin, 2015; Francis et al., 2001; Kabir et al., 2020; Krogdahl et al., 2005; Stone, 2003; Wilson, 1994). O, puede modificar de los niveles de aminoácidos esenciales lo que obliga a suplementar el resto de las dietas a evaluar.

El problema descrito y asumido como irresoluble se entiende mejor sin duda con un ejemplo real sobre una composición experimental extraída en este caso de Austreng & Refstie, 1979. Así en la Figura 16 podemos ver la traducción parcial de las tablas I y II de dicho trabajo. Trabajo que evalúa la variación de los niveles en dieta de la proteína para diferentes familias de trucha arcoíris.

Figura 16: Traducción de las tablas I y II de Austreng & Refstie, 1979

Tabla I: Composición de las dietas experimentales conteniendo diferentes niveles de proteína (g/kg)

Dietas experimentales	DI	DII	DIII	DIV
Ingredientes (g/kg)				
Harina de capelán	210	340	470	600
Harina de maíz	280	187,8	95,7	3,5
Aceite de capelán	163,5	125,7	87,8	50
Otros ingredientes constantes en todas las dietas	346,5	346,5	346,5	346,5

Tabla II: Resultados de los análisis químicos de las dietas experimentales con diferentes niveles de proteína

Dietas experimentales	DI	DII	DIII	DIV
Materia seca (%)	90	90	90	90
Proteína Cruda (%)	23,7	32,9	42	51,2
Grasa Cruda (%)	22,6	20,5	18,3	16,2
Extracto libre de Nitrógeno (ELN) (%)	35,1	27	19	10,9
Cenizas (%)	6,2	7,3	8,3	9,4
Calcio (%)	1,08	1,25	1,42	1,59
Fósforo (%)	0,64	0,81	0,97	1,14
Energía Bruta (MJ/kg)	20,5	20,7	20,8	20,9

Si atendemos a los datos de la Figura 16, sin duda supone una dificultad incrementar la proteína cruda (PC) o bruta (PB) desde un 23,7 % de la Dieta I (DI), en la que se incluyen 200 g/kg de harina de capelán, a un 51,2 % PB de la Dieta IV (DIV) en la que se incluye 600 g/kg de harina de capelán. Esta reducción de 400 g de materia prima (harina de capelán) obliga a los investigadores a incluir en la DI: 113,5 g más de aceite de capelán, y 276,5 g de harina de maíz. Mientras una parte de los ingredientes permanece fija (346,5 g) (datos de composición no mostrados) esta reducción esto afecta tanto a los niveles de PC 23,7 % de la

DI frente a los 51,2 % de la DIV, afecta también al fósforo 0,64 % de la DI frente al 1,14 % de la DIV, así como al resto de macronutrientes grasa, ELN o micronutrientes como el calcio, las cenizas, etc. como se puede observar en la Figura 16. Y en menor medida a la energía, ya que se pretende en las formulaciones mostradas en este experimento que, aunque los niveles de proteína varíen las dietas (DI a DIV) sean isoenergética (aproximadamente 20,5 – 20,9 MJ/kg en las dietas DI y DIV respectivamente).

Situación inevitable reiteramos, en cualquier caso, si queremos testar varios niveles de inclusión de MN o mN, de proteína en una dieta, de ácidos grasos, o diferentes niveles de sustitución de materias primas como la harina de pescado, aceite de pescado, aminoácidos, etc. por otras materias primas vegetales, harinas de soja por insectos, etc.

Ante este dilema parcialmente irresoluble la propuesta de este trabajo es elevar la humedad en la dieta en la que se pretende la reducción hasta conseguir el nivel deseado de proteína, por lo que los demás niveles de MN o mN variaran proporcionalmente en la cantidad de humedad aportada. Esto se podría conseguir fácilmente reduciendo la tasa de alimentación proporcionalmente (si es lo deseado). Volviendo al ejemplo inicial en el que pretendíamos reducir de un 56 % a un 40 % la proteína de la dieta, el cálculo a realizar es sencillo. Pero indefectiblemente la sensación de saciedad provocada por la ingesta de un tanto por ciento menos de dieta (en peso) podría tener otras consecuencias alterando por ejemplo los niveles de estrés en los animales.

Así, en la Figura 17 mostramos nuestra propuesta de dietas, para el hipotético caso de que quisiéramos emular y confirmar los resultados del experimento de Austreng & Refstie, 1979 y comprobar realmente cómo afecta al crecimiento de la trucha arcoíris la variación de los niveles de proteína en las dietas.

Así en la propuesta realizada (Figura 17) no se modifican los niveles de inclusión de ninguna materia prima, por lo que los niveles de proteína de todas las dietas (DI, DII, DIII y DIV) tienen una misma fuente. Solo y salvo que se quisiera mantener invariable la energía de todas las dietas habría que introducir una grasa o carbohidratos en la proporción requerida.

Figura 17: Propuesta de alternativa a las dietas experimentales de Austreng & Refstie, 1979

Dietas experimentales	DI	DII	DIII	DIV
Proteína cruda inicial DIV				51,2
Nivel deseado de Proteína Cruda (%) en el resto de dietas	23,7	32,9	42	
Nivel de inclusión de la DIV (%)	46,28	64,25	82,03	
Nivel necesario de humedad a incluir en la dieta (100- %DIV)	53,72	35,75	17,97	
Total en peso (g)	100	100	100	100
Composición final de los demás elementos de la dieta				
Grasa Cruda (%)	7,50	10,41	13,29	16,2
Extracto libre de Nitrógeno (ELN) (%)	5,04	7,00	8,94	10,9
Cenizas (%)	4,35	6,04	7,71	9,4
Calcio (%)	0,74	1,02	1,30	1,59
Fósforo (%)	0,53	0,73	0,94	1,14
Energía Bruta (MJ/kg)	9,67	13,43	17,14	20,9

Esta modificación propuesta sobre Austreng & Refstie, 1979 también se asemeja más a la realidad de lo que sucede en una piscifactoría cuando los peces se alimentan de manera deficiente (por cualquier motivo), incluido las posiciones de dominio de unos ejemplares frente a otros en un tanque o jaula, etc. Situaciones muy comunes en la piscicultura ya que no todos los ejemplares de un grupo de experimentación o de una unidad de cultivo se alimentan por igual. Lo que conlleva sin duda una dispersión de tallas en el crecimiento.

Al igual que en el trabajo de Austreng & Refstie, 1979, esto sucede de manera similar y reiteramos ineludible en los numerosos experimentos en los que se evalúan diferentes niveles de inclusión de harinas de pescado (Cho et al., 1994; De Francesco et al., 2007; Lupatsch, 2003). Por el contrario, la metodología propuesta (mediante la de sustitución o reemplazo por humedad) conlleva de inicio una virtud, y es que en principio el agua no altera el resto del contenido nutricional de las dietas —salvo el volumen (g/kg)— por lo que tan solo se reducen los MN o materias primas en la proporción deseada.

La duración del experimento se estimó en tres meses como un tiempo suficiente como para ver una clara evolución de los pesos de los animales. La evaluación del crecimiento se realizó mediante el estudio de diversos parámetros clásicos de crecimiento.

Como objetivo secundario se estableció incrementar el conocimiento en los ingredientes utilizados en el resto de formulaciones de las dietas de este trabajo y en concreto del agua de las levaduras de desecho.

Por un lado, el agua que acompaña de manera inevitable a las levaduras después del proceso de fermentación (hasta un 85 % del peso húmedo de las levaduras de desecho) esta pobremente caracterizada. Esta agua es un residuo contaminante sin ningún valor, y se desconoce si puede tener algún efecto sobre el crecimiento de los peces ya que puede contener restos de levaduras, enzimas, etc. Por otro lado, es actualmente un problema para la industria cervecera por su alto contenido teórico en materia orgánica y una fuente de contaminación de acuíferos (si esta agua no es previamente depurada antes de su vertido a la red de alcantarillado general, o a los cauces fluviales) (Ministerio de Medio Ambiente, 2005). Esta agua de desecho también podría interferir en algunas de las dietas formuladas para esta tesis, ya que las levaduras de desecho no se han deshidratado, y los piensos realizados (véase Materiales y métodos) pueden considerarse semi-húmedos (+ de un 40% de humedad).

Finalmente, el uso de esta metodología y la realización de este experimento debería permitir evaluar si las actuales dietas están nutricionalmente subestimadas o sobreestimadas. Es decir, si alimentamos a los peces en exceso. O, si por el contrario una reducción en los valores nutricionales de la ingesta (100 %) en un 50 % pero sin reducir la ingesta total en peso (g/kg) modifica el comportamiento de los animales incrementando los episodios de canibalismo o agresiones con la consiguiente merma económica que esto supone durante la crianza del alevinaje de las especies carnívoras como la dorada (*S. aurata*).

III.2 Materiales y métodos

De manera resumida se describen los materiales y métodos llevados a cabo para la correcta consecución de los objetivos planteados.

III.2.1 Peces

Doscientas doradas de peso inicial $5,28 \pm 0,06$ g (n=200) se obtuvieron de una granja local ubicada en Águilas (Murcia, España). Los peces fueron aleatoriamente distribuidos en ocho tanques cilíndricos iguales y aclimatados durante 15 días antes de comenzar el experimento, durante este periodo fueron alimentados (al 3% de su biomasa /día según especificaciones técnicas del fabricante) con una dieta comercial para esta especie Mar Perla L (Skreting, Burgos, España). Misma dieta que luego se utilizará durante el experimento.

Las condiciones de agua y temperatura se han descrito anteriormente en Materiales y Métodos. Capítulo I, así como los métodos de realización de los muestreos, toma de muestras biométricas, etc.

Durante el experimento se evaluaron cuatro dietas, que se describen a continuación, y se establecieron cuatro grupos experimentales con sus correspondientes replicas (duplicado) (n=50).

III.2.2 Dietas

Durante el experimento se utilizaron diferentes dietas, una dieta experimental: Para el Grupo A se utilizó la dieta A: Mar Perla L específicamente formulada para dorada, (Skreting, Burgos, España) a un 3% de la biomasa del tanque / día (g/kg/día). Tasa calculada según tablas de alimentación del fabricante para esta talla y la temperatura de las instalaciones.

La dieta A se seleccionó por ser industrial y adecuada para la especie. El nivel de macronutrientes de esta dieta es 56 % de proteína bruta, y un 15 % de grasas y aceites crudos. La principal fuente de proteína de esta dieta es un 48,4 % de harina de pescado (de calidad indeterminada) y una cantidad de aceite de pescado (de origen indeterminado) un 5,34 % de un total de un 15 % de grasas y aceites. La única fuente adicional de lípidos de la formulación a los que aporta la harina de pescado es este aceite de pescado.

Para el resto de grupos experimentales se utilizó la Dieta A, y al peso resultante de las tablas de alimentación del fabricante (3 % biomasa del tanque/ día) se le restó un 50 % diario (g/kg). Ese 50 % de peso extraído de la dieta se substituyó por agua destilada esterilizada (Dieta B), agua de mar estéril (36 ppm, Dieta C) y agua de desecho de levaduras industriales separada de las levaduras por decantación en un cono Imhoff (Dieta C).

Por lo que los tratamientos para cada tanque quedaron configurados de la siguiente forma:

Grupo A: Dieta A:

Mar perla L (3% s/ biomasa / día)

Grupo B, Dieta B:

Mar perla L (1,5 % s/ biomasa / día) + (1,5 % agua destilada * biomasa / día)

Grupo C, Dieta C:

Mar perla L (1,5 % s/ biomasa / día) + (1,5 % agua de mar estéril * biomasa / día)

Grupo D, Dieta D:

Mar perla L (1,5 % biomasa / día) + (1,5 % agua de levaduras * biomasa / día)

III.2.2.1 Inclusión de la humedad en las dietas

El modo de como humedecer el pienso resulta importante desde el punto de vista de metodológico, el pienso se humedecía justo antes de suministrarlo para evitar contaminaciones o crecimientos fúngicos indeseables. Una vez pesado un 1,5 % del peso deseado por tanque, en un falcón de 50 ml situado en una gradilla, y sobre una balanza de precisión se iban añadiendo gotas de agua de cada tratamiento hasta alcanzar el 3 % de la biomasa / día (con una pipeta estéril). Antes de administrarlo a los peces tan solo se dejaba reposar el tiempo necesario para que los gránulos absorbieran el agua, proceso relativamente rápido, al ser el pienso industrial hidrófilo y contener aproximadamente un 7 – 8 % de humedad. En algo menos de un minuto con el falcón tapado y en una gradilla se consideraba que al pienso le había dado tiempo a absorber la humedad (50 %) sin modificar sus propiedades (en definitiva, los gránulos no se deshacían), por lo que se procedía a suministrarlos a los peces sin inconveniente de que sus cualidades físicas se hubieran comprometido.

III.2.3 Diseño experimental

Los peces fueron estabulados durante 90 días y fueron alimentados un total de 77 (excluidos domingos y los dos días previos a los muestreos). La tasa de alimentación fue de un 3 % de la biomasa inicial total de cada tanque según las tablas de la proveedora del pienso. La recogida de muestras se realizó siguiendo el protocolo descrito en el capítulo I. Materiales y métodos para el peso.

III.2.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó según lo descrito en los Materiales y métodos generales de la presente Tesis Doctoral. También se utilizaron análisis de regresión para estimar las relaciones entre el crecimiento y la ingesta.

III.3 Resultados y discusión

III.3.1 Comportamiento, canibalismo y mortalidad

En relación con la mortalidad, no se observó ninguna en los ejemplares alimentados con las diferentes dietas experimentales. Y tampoco, se produjeron episodios de canibalismo frecuentes en estas tallas de dorada cuando la alimentación es insuficiente, o de agresiones entre los diferentes animales estabulados. Factor que se controló mediante inspección visual a diario, y en todos los muestreos, ya que sin duda y dada la talla inicial de los peces, y la alimentación deficitaria todo indicaba que existía un riesgo alto de que esto sucediera con frecuencia. Al no suceder ningún episodio de canibalismo, ni de agresiones en ninguno de los ocho tanques (4 grupos), y 200 peces $5,28 \pm 0,06$ g— en total por un tiempo de 90 días se debe entender que los peces estaban saciados independientemente del nivel nutricional de la dieta. Sorprendentemente los peces de los grupos B, C y D aun siendo su alimentación reiteramos (en nutrientes) inferior en un 50 % de lo recomendado no presentaron este tipo de comportamientos y agresividades entre individuos. Del mismo modo, en general el comportamiento de los animales estabulados fue durante todo el experimento de tranquilidad, sin episodios de estrés, ausencia de heridas provocadas por agresión. Tampoco se produjo ninguna mortalidad por patologías, o causas desconocidas, ni por los habituales saltos fuera de los tanques de los animales presionados por sus congéneres (a veces provocados por agresiones o situaciones de dominancia).

III.3.2 Crecimiento

A partir de los datos obtenidos durante los muestreos biométricos realizados los días 0, 6, 23, 40, 68 y 90 [final de peso (P), ($g \pm 0,01$)] y la ración diaria proporcionada a cada grupo experimental se pudieron calcular los parámetros relativos al crecimiento de los peces y el aprovechamiento de la alimentación proporcionada. Los métodos relativos a dichas medidas se describen en el capítulo I. Materiales y métodos, *vide supra*.

El número total de días que los peces fueron alimentados por periodo de medida del peso respectivamente fueron en los siguientes intervalos de días o periodos (P) entre muestreos: P1: 6 días; P2: 14 días; P3: 14 días; P4: 24 días, P5: 19 días; en total 77 días alimentados de un total de 90 días. Así en la Figura 18 se muestra la evolución de las cantidades suministradas de las dietas A, B, C y D a cada grupo experimental (coincidentes en denominación), actualizado entre cada tiempo de muestreo. Por un lado, en las columnas se representan las cantidades diarias suministradas ese periodo (P1 a P6), y por otro lado la evolución se muestra mediante curvas de regresión polinómicas de grado 2 de la ingesta o dieta suministrada para los Grupos A y D, Dietas respectivamente A y D.

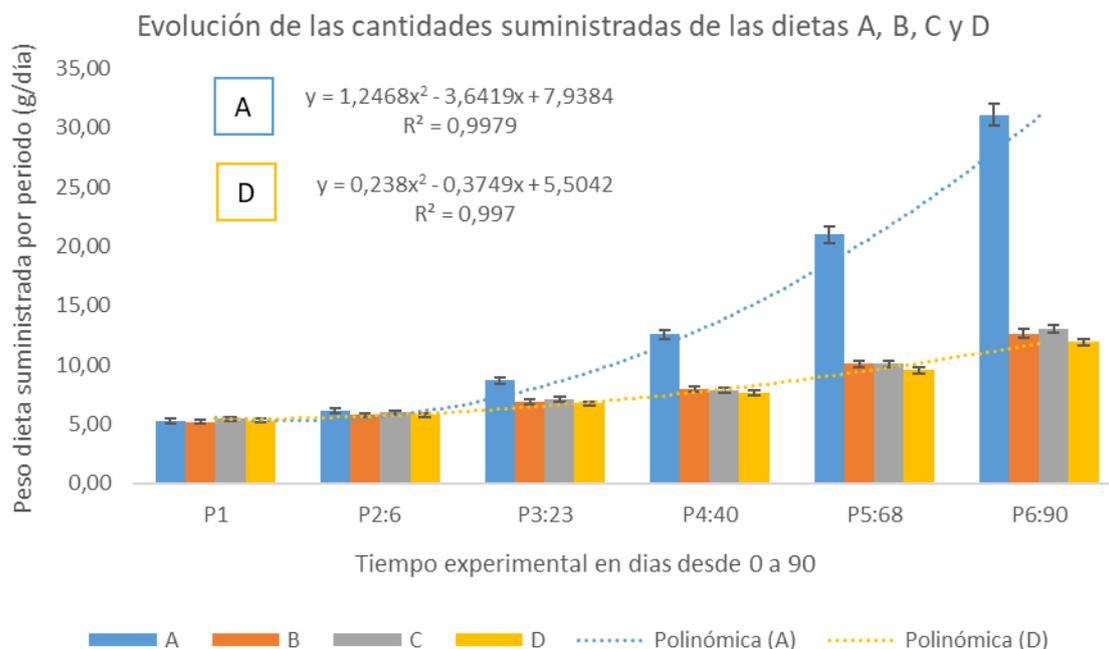


Figura 18. Evolución de las cantidades suministradas de las dietas A, B, C y D. Ingesta diaria y total de los peces alimentados con las dietas experimentales (Grupos A, B, C y D). Las columnas representan la ingesta de cada grupo experimental en cada periodo (P1 a P6) y el número total de días desde el inicio. 0, 6, 23, 40, 68 y 90 días. Mientras que las curvas, así como las ecuaciones, son las resultantes de los grupos A y D. No se muestran las curvas de pienso suministrado, ni las ecuaciones de los grupos B y D que son iguales que las del D.

En la Figura 18 también se puede observar el efecto “perverso” del tiempo sobre el crecimiento cuando las tasas de alimentación se fijan en un tanto % fijo sobre la biomasa inicial. Y aunque esta tasa y la biomasa del experimento se evalué en determinados puntos de muestreo, el retraso y menor crecimiento de unos grupos frente a otros (en este caso los grupos B, C, y D) hace que las diferencias se aumenten exponencialmente a cada periodo de tiempo. Por eso además de la tasa de alimentación en este caso fija de un 3 % sobre biomasa y día, los datos deben acompañarse de la ingesta total preferiblemente por pez o grupo de manera que cualquier investigador pueda en caso de ser necesario recalcular los datos (*v.g.* para un meta-análisis sobre cualquier factor).

En la Figura 19 se muestra la diferencia final en la ingesta total por Grupo A, B, C y D (cantidades promedio de los tratamientos de las dietas A, B, C y D administradas por duplicado)

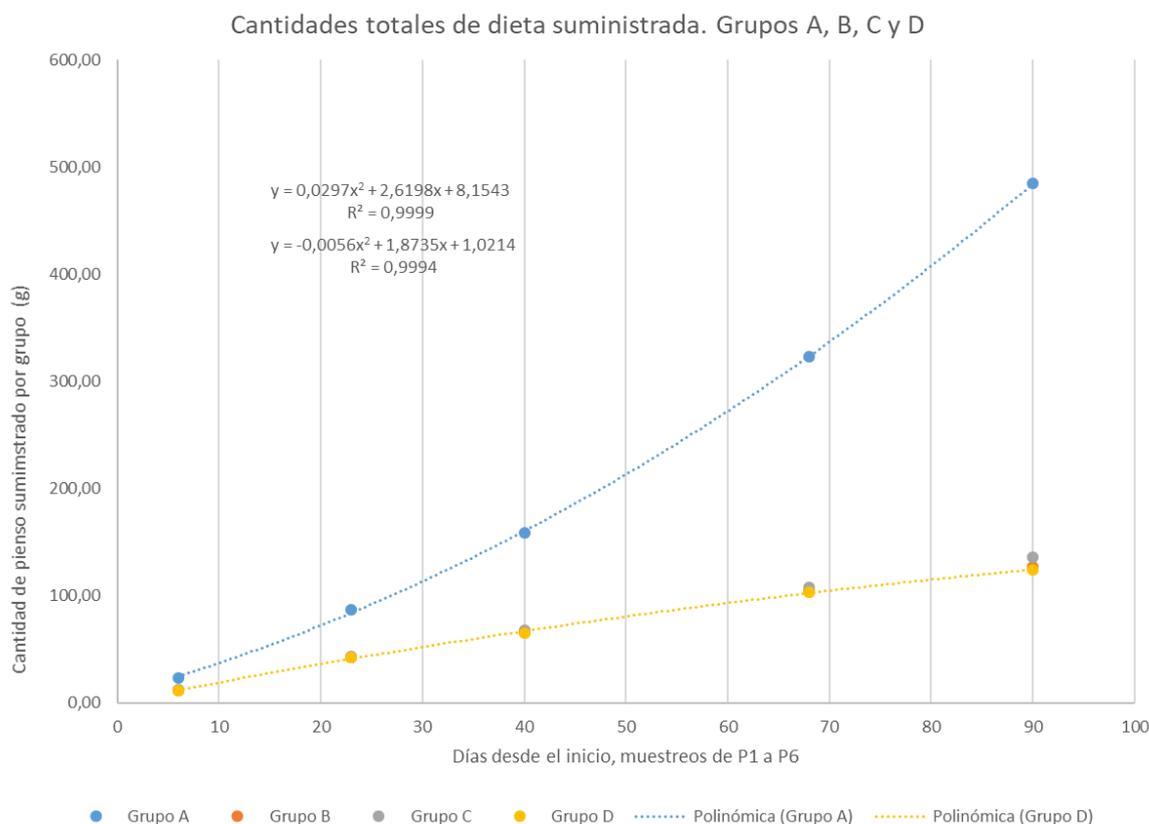


Figura 19. Cantidades totales de dieta suministrada por grupo. (Grupos A, B, C y D). Los puntos representan las cantidades acumuladas de pienso por cada grupo experimental en los periodos (P1 a P6). Mientras que las curvas, así como las ecuaciones, son las resultantes de los grupos A y D. No se muestran las curvas de los grupos B y D, ni las ecuaciones de los grupos B y D ya que son iguales y prácticamente se superponen al grupo D. Como se puede comprobar en los puntos del grupo B que aun estando representados se encuentran tapados por los otros dos grupos de menor ingesta C y D nutricional.

Así en la Figura 19 también se puede observar el efecto “perverso” sobre la mala distribución de la alimentación durante un experimento, y su efecto sobre el crecimiento. Mientras que el Grupo A, Dieta A ha recibido realmente un 3 % de alimento sobre su biomasa y día (aproximadamente 500 g en total por tanque), los Grupos B, C y D con una ingesta nutricional del 50 % de la Dieta A, tan solo han recibido aproximadamente 125 g, lo cual supone una merma en la alimentación durante el tiempo de experimentación de un 80 % menos aproximadamente. Y eso que tan solo son 90 días, un tiempo muy inferior al tiempo habitual de cultivo. Siendo la ingesta relativa por grupos, A, B, C y D (%) la que se muestra en la Figura 20.

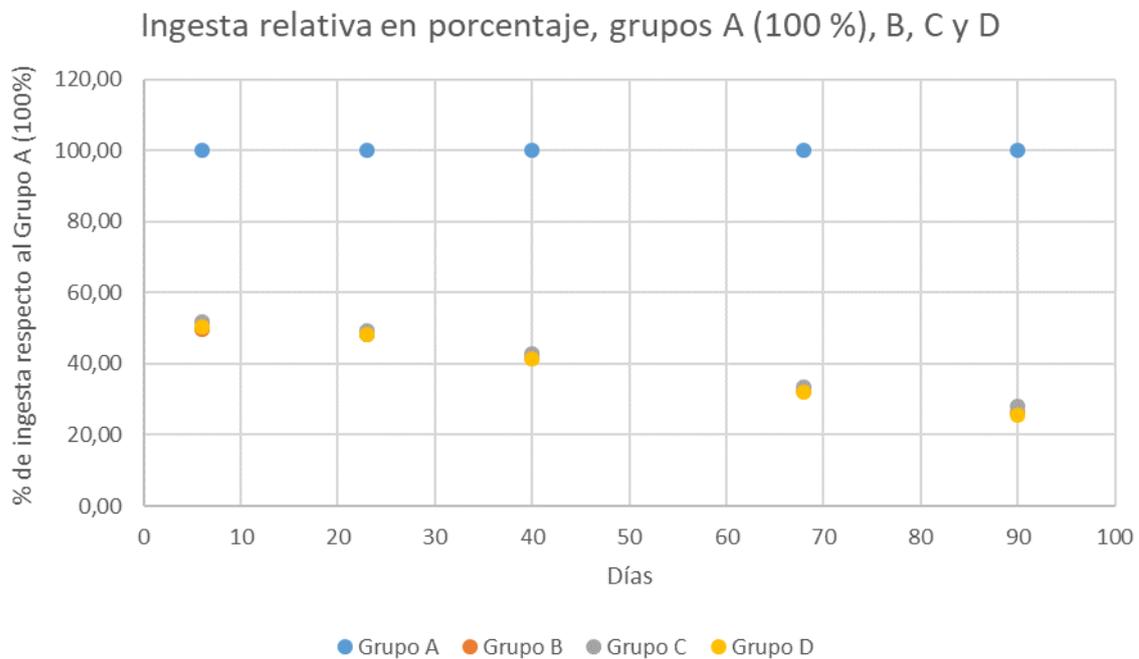


Figura 20. Ingesta relativa (en porcentaje), Grupos A (100 %), B, C y D. Los puntos representan los porcentajes de administración de las dietas por grupo (A, B, C, D) a 6,23,40, 68 y 90 días.

A raíz de estas diferencias forzadas en la ingesta (sustitución del 50 % del valor nutricional de la Dieta A en las dietas B, C y D por 0 % del valor nutricional) se produce el segundo efecto “perverso” sobre el crecimiento. Este crecimiento al no producirse de igual modo en todos los grupos, siendo el crecimiento del grupo A normal —según tablas de alimentación del fabricante del pienso para la temperatura experimental—, y el de los grupos B, C y D, mucho más reducido de lo esperado, por el efecto tasa (%) de alimentación sobre biomasa en el tiempo.

Por este efecto multiplicador periodo tras periodo que los peces de los grupos B C y D crecen menos, se ha producido una dispersión de tallas enorme como se puede comprobar en la siguiente Figura 21. Dispersión que se incrementa a medida que pasa el tiempo.

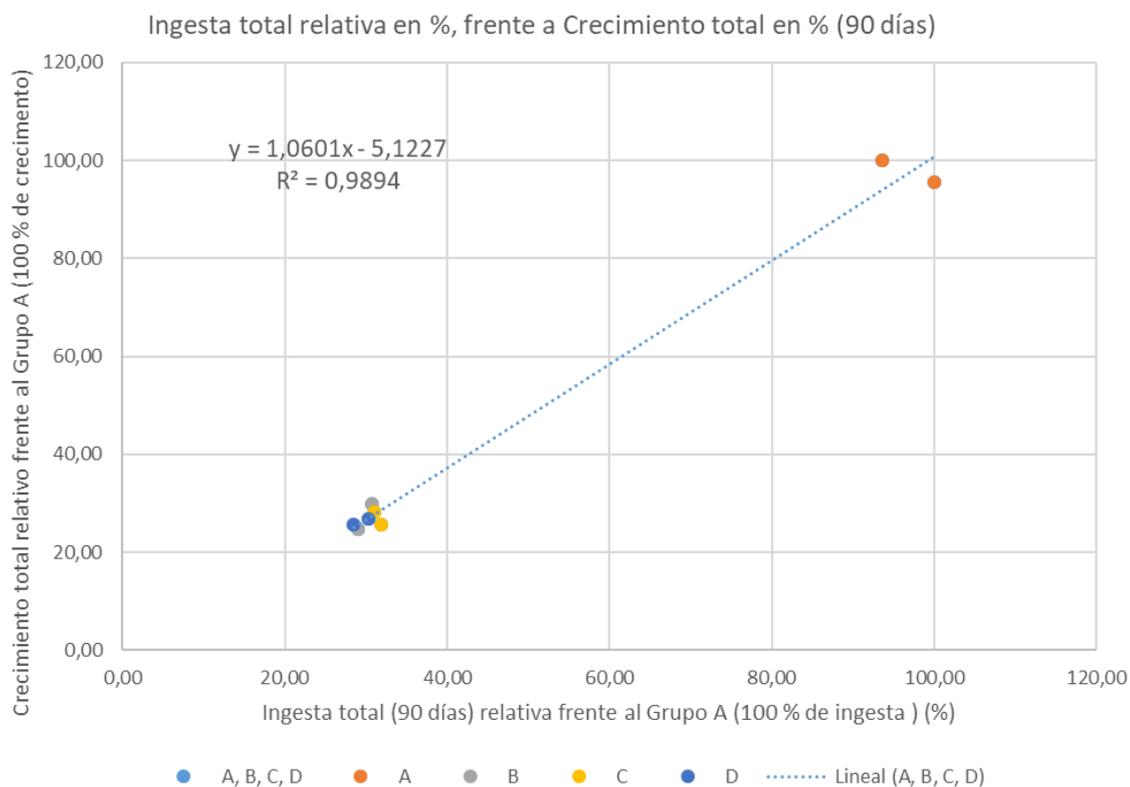


Figura 21. Ingesta relativa (%), de los Grupos A, B, C y D, frente al Grupo A (o 100 % de ingesta nutricional). Representado frente al crecimiento relativo (%) de los Grupos A, B, C y D, frente al Grupo A (o 100 % de crecimiento). Los puntos representan los porcentajes por Grupo y tanque (duplicados del grupo) a 90 días. La ecuación representa la regresión lineal del crecimiento relativo (%) frente a la ingesta relativa (%) para todos los grupos (y tanques duplicados).

Así en las Figuras 21 y 22 se aprecia la linealidad del crecimiento frente a la ingesta (ecuación no mostrada en la Figura 22) para todos los tiempos y grupos, ya que independientemente del valor nutricional de la ingesta, el crecimiento es un reflejo de la cantidad total ingerida, el valor nutricional de la porción asimilada y el porcentaje de retención de los nutrientes de la dieta. Dada la calidad similar de las dietas, pero no la cantidad, la asimilación de la misma y su reflejo en crecimiento para una misma etapa de desarrollo debe ser lineal (tal y como se representa en la Figura 21) con pequeñas diferencias debidas a la variabilidad genética de los individuos, y el reflejo de esta variabilidad en los promedios de pesos por tanque y por grupo. Factores ampliamente conocidos en nutrición.

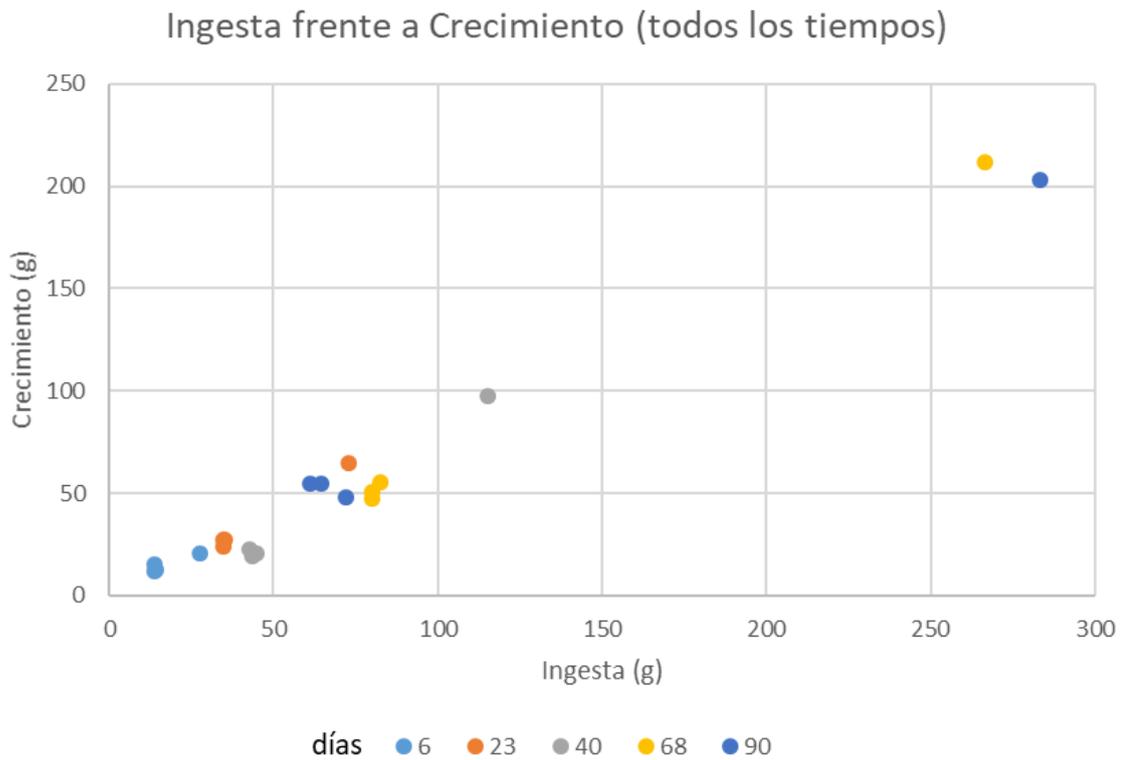


Figura 22. Diagrama de dispersión de puntos de los diferentes grupos experimentales, representando la ingesta frente al crecimiento, en peso (g) y en los diferentes puntos de muestreo P1 a P6. Los puntos representan los pesos de ingesta promedio en (g) por el peso pez promedio de cada grupo (A, B, C, D) y sus valores son los resultantes de la ingesta (g) frente al crecimiento (g) promedio del duplicado y grupo a 6,23,40, 68 y 90 días.

Los resultados obtenidos han sido representados en las Figuras 18 a 22, y se puede observar en ellas como el crecimiento está mediado por la ingesta (Iwama, 1996; Storebakken & Austreng, 1987a, 1987b; Sveier & Lied, 1998), la cual determina la cantidad de nutrientes que les aportamos a los peces a través de piensos extruidos, formulados y adecuados para la especie.

Como podemos observar en las Figuras 18, 19 y 20 que representan la Ingesta frente al tiempo existen diferencias entre los grupos experimentales A (Alimentación normal) frente a los grupos B, C y D (alimentación reducida en un 50 % de su valor nutricional) y esta ingesta adopta una forma de ecuación polinómica de 2 grado estando cada vez más lejos los valores entre los peces alimentados del grupo A y los alimentados en el resto de los grupos (B, C y D).

Por el contrario, los valores del Índice de Conversión del Alimento (ICA) no difieren mucho de los que podían considerarse un buen valor de conversión para la dorada en esa talla y para todos los grupos. Siendo los valores $ICA \pm$ error estándar, y el ICAC (corregido en humedad) los siguientes para cada grupo experimental (Tabla 7):

Tabla 7: Índices de conversión del alimento normal y corregido

Grupo	ICA	ICAC	ICAC (dieta)
Grupo A/Dieta A	1,12 \pm 0,06	1,12	1,12
Grupo B/Dieta B	1,23 \pm 0,08	0,67	0,67
Grupo C/Dieta C	1,31 \pm 0,09	0,71	0,44
Grupo D/Dieta D	1,25 \pm 0,01	0,68	0,42

Valores promedio \pm error estándar de la media.

ICA: Índice de conversión del alimento

ICAC: Índice de conversión del alimento corregido en humedad

ICAC: $[ICA \cdot (100 - \% \text{ humedad dieta})] / (100 - 8)$

ICAC: Considerando una humedad por la inclusión del agua en la A de un 8% y en las B de un 8 + 50 %

ICAC (dieta): Considerando una humedad inicial en la dietas A y B de un 8% y en C y D de un 43 %

Valores de conversión del alimento (ICA) que podemos decir sin temor a equivocarnos que son normales para las condiciones experimentales i) especie, ii) talla, iii) temperatura, iv) dieta e v) ingesta y prácticamente son similares entre ellos, y con los valores de conversión del alimento que se pueden considerar normales en una piscifactoría. Estos valores una vez corregidos en la humedad (ICAC e ICAC (dieta)) a un porcentaje estándar de las dietas industriales para un pienso seco extruido (8 % sobre peso húmedo del pienso), permite comprobar que los peces alimentados con las dietas B, C, y D, presentan mejores valores de conversión que su contraparte A (o alimentación óptima). Es decir, han sido más eficientes en la conversión de alimento sí se normaliza en la realidad nutricional y de materia seca de las dietas.

Se ha entendido innecesario realizar una comparación estadística sobre estos valores ya que las diferencias en crecimiento son abismales. Tan solo se muestran los valores de ICA y ICAC para exponer el parecer del doctorando de lo mal predictor del crecimiento, o de la eficiencia que es este tipo índices. Pero evidentemente y como no podía ser de otro modo al cabo de noventa días los peces «mal alimentados», los grupos B, C y D llevan un retraso en el crecimiento de más de sesenta días de talla frente al grupo A (Figura 22).

III.3.3 La dispersión de tallas en acuicultura

En este caso, esta «mala alimentación» es forzada, pero por muchos motivos puede ser forzosa, sobre todo en condiciones industriales de crianza, o en condiciones de investigación con los peces como modelos animales (fenómenos atmosféricos como tormentas y temporales que impiden realizar la alimentación en las jaulas durante determinados periodos, situaciones de dominancia en los tanques por algunos ejemplares, canibalismo, etc.) (Andrew et al., 2004; Baras et al., 2011; Baras & Jobling, 2002; Naumowicz et al., 2017).

En definitiva, esta variación deseada o indeseada en la ingesta no es una situación anormal en acuicultura y en todos los sistemas (recirculación, esteros, biofloc, jaulas, etc.) por lo que es normal que los peces crezcan con una dispersión acusada alcanzando el peso objetivo comercial aproximadamente tan solo aproximadamente entre el 35 % - 45 % de los ejemplares, mientras que el resto alcanzan pesos o bien por encima de la media (cabezas), o bien por debajo (colas) (Berge, 2021; Marine Harvest, 2018).

Es interesante mostrar los datos reales de la industria en este momento, Figura 23, ya que, aun siendo la industria del salmón noruego paradigma de eficiencia a nivel mundial son patentes las limitaciones sobre el control de los cultivos por parte del acuicultor. Y son patentes las posibles e inevitables diferencias en la administración de las dietas y reparto proporcional del pienso equitativamente entre ejemplares, por las situaciones de dominancia, de enfermedad o por entre otras los tratamientos antiparasitarios o antibióticos tienen su reflejo en un menor crecimiento, un retraso del crecimiento de determinados ejemplares y en una dispersión por tallas indeseada por parte del acuicultor. En la Figura 23, se muestra realmente cual es la dispersión de tallas para el salmón en Noruega, para las cosechas del año 2018. Datos extraídos del “Salmon Industry Handbook” mediante Webplot Digitizer 4.5 y autorizados para su exhibición por Mowi (antes Marine Harvest). (Marine Harvest, 2018).

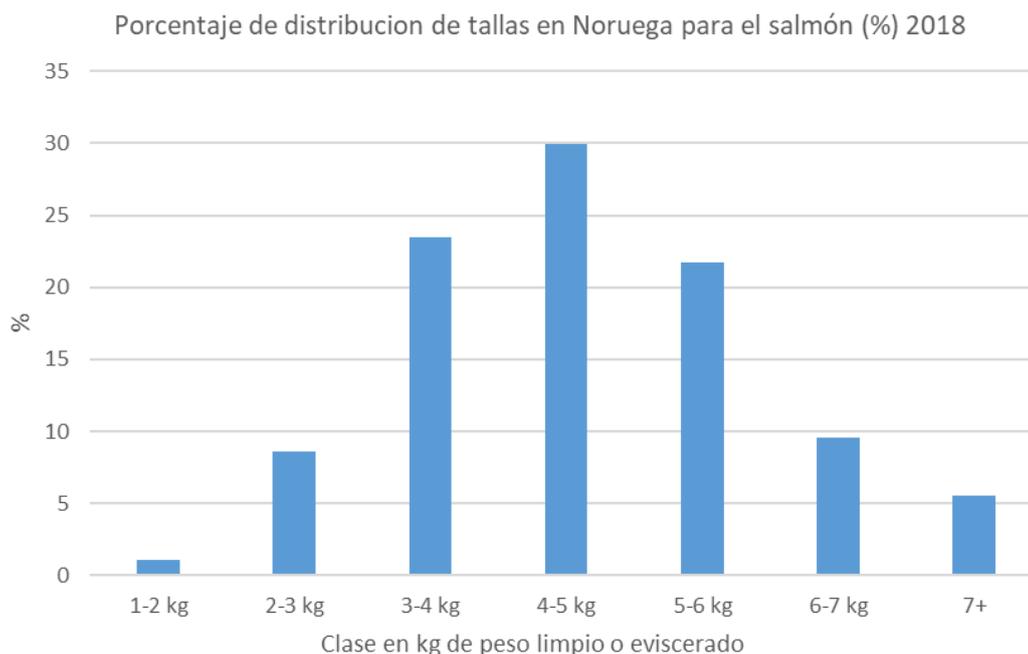


Figura 23. Diagrama de barras de la dispersión del salmón eviscerado en Noruega, para el año 2018. Extraído del Salmon Industry Handbook, (autorizado) en el que se muestra el porcentaje de distribución de tallas en Noruega en el año 2018 en porcentaje para el salmón eviscerado, en diferentes categorías o clases comerciales que van desde un kilo a más de 7 kg. (Marine Harvest, 2018)

Dispersión que ha sido recogida en numerosas ocasiones y en diferentes estudios, (Iwama, 1996; Storebakken & Austreng, 1987a, 1987b; Sveier & Lied, 1998) y que en muchas ocasiones se debe a la ingesta, mientras que otras puede deberse a otros episodios como pudieran ser las desinfecciones, tratamientos sanitarios, enfermedades o la contaminación ambiental (Davidson et al., 2019; Schrader et al., 2013; Walde et al., 2022)

Y esta dispersión inevitablemente tiene una traducción económica en los precios de venta. Traducido literalmente de la noticia y de las declaraciones realizadas por un productor a Aslak Berge (18/junio/2021), «Mientras que los tamaños de pescado más pequeños bajan de precio la próxima semana, el salmón grande será más caro.», «Y esto tiene una traducción económica en los precios de venta. “Grandes diferencias 2-3 kg a 49 coronas (4,9 EUR), 3-4 kg a 54-55 coronas (5,4-5,5 EUR), 4-5 kg a 59-60 coronas (5,9-6,0 EUR), 5-6 kg a 65 coronas (6,5 euros), 6+ a 70 coronas (7,0 euros)”, relata.», «“Es una diferencia de precio increíblemente grande entre las clases de peso bajo y alto. Rara vez se ve una diferencia de precio tan grande”, dijo y señaló en particular la exigente situación de salud de los peces como una explicación obvia.» (Berge, 2021).

Datos de crecimiento entre cabezas y colas, que además de tener una implicación biológica (con a veces difícil pronóstico sobre que la ha producido), es sin duda uno de los factores de mayor repercusión en el aspecto económico de la acuicultura ya que se materializa directamente en el precio final del producto, y el momento de acceso del producto al mercado. Siendo este un factor que se analizará en mayor profundidad en el análisis bioeconómico que se incluye en este trabajo.

III.4 Bibliografía

- Andrew, J. E., Holm, J., Kadri, S., & Huntingford, F. A. (2004). The effect of competition on the feeding efficiency and feed handling behaviour in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) held in tanks. *Aquaculture*, *232*(1), 317-331. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00528-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00528-3)
- Austreng, E., & Refstie, T. (1979). Effect of varying dietary protein level in different families of rainbow trout. *Aquaculture*, *18*(2), 145-156. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(79\)90027-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(79)90027-9)
- Baras, E., Aguila, D. V. S. del, Naranjos, G. V. M., Dugué, R., Koo, F. C., Duponchelle, F., Renno, J.-F., Garcia-Dávila, C., & Nuñez, J. (2011). How many meals a day to minimize cannibalism when rearing larvae of the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer*? The cannibal's point of view. *Aquatic Living Resources*, *24*(4), 379-390. <https://doi.org/10.1051/alr/2011141>
- Baras, E., & Jobling, M. (2002). Dynamics of intracohort cannibalism in cultured fish. *Aquaculture Research*, *33*(7), 461-479. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00732.x>
- Berge, A. (2021, junio 18). Heavy volumes of small salmon give a large gap between the weight classes. *SalmonBusiness*. <https://salmonbusiness.com/heavy-volumes-of-small-salmon-give-a-large-gap-between-the-weight-classes/>
- Buhler, D. R., & Halver, J. E. (1961). Nutrition of Salmonoid Fishes: IX. Carbohydrate requirements of Chinook Salmon. *The Journal of Nutrition*, *74*(3), 307-318. <https://doi.org/10.1093/jn/74.3.307>
- Castillo, S., & Gatlin, D. M. (2015). Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. *Aquaculture*, *435*, 286-292. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.011>
- Cho, C. Y., Hynes, J. D., Wood, K. R., & Yoshida, H. K. (1994). Development of high-nutrient-dense, low-pollution diets and prediction of aquaculture wastes using biological approaches. *Aquaculture*, *124*(1-4), 293-305. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90403-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90403-0)
- Cowey, C. B., & Cho, C. Y. (1993). Nutritional requirements of fish. *Proceedings of the Nutrition Society*, *52*(3), 417-426. <https://doi.org/10.1079/PNS19930082>
- Cowey, C. B., Mackie, A. M., & Bell, J. G. (1985). *Nutrition and feeding in fish*. Academic Press.
- Craig, S., & Helfrich, L. (2002). Understanding Fish Nutrition, Feeds, and Feeding. *Virginia Cooperation Extension*.
- Davidson, J., Summerfelt, S., Straus, D. L., Schrader, K. K., & Good, C. (2019). Evaluating the effects of prolonged peracetic acid dosing on water quality and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* performance in recirculation aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, *84*, 117-127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.12.009>

- De Francesco, M., Parisi, G., Pérez-Sánchez, J., GÓMEZ-RÉQUENI, P., MéDale, F., Kaushik, S. J., Mecatti, M., & Poli, B. M. (2007). Effect of high-level fish meal replacement by plant proteins in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on growth and body/fillet quality traits. *Aquaculture Nutrition*, *13*(5), 361-372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00485.x>
- Francis, G., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, *199*(3), 197-227. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9)
- Gatlin, D. M. (2003). 12—Nutrition and Fish Health. En J. E. Halver & R. W. Hardy (Eds.), *Fish Nutrition (Third Edition)* (pp. 671-702). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012319652-1/50013-6>
- Halver, J. E., & Hardy, R. W. (Eds.). (2002). *Fish nutrition. 3rd Edition* (3rd Edition). Academic Press.
- Iwama, G. K. (1996). Chapter 7—Growth of Salmonids. En W. Pennell & B. A. Barton (Eds.), *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 29, pp. 467-515). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0167-9309\(96\)80010-X](https://doi.org/10.1016/S0167-9309(96)80010-X)
- Kabir, K. A., Verdegem, M. C. J., Verreth, J. A. J., Phillips, M. J., & Schrama, J. W. (2020). Effect of dietary carbohydrate to lipid ratio on performance of Nile tilapia and enhancement of natural food in pond aquaculture. *Aquaculture Research*, *are.14546*. <https://doi.org/10.1111/are.14546>
- Krogdahl, A., Hemre, G.-I., & Mommsen, T. P. (2005). Carbohydrates in fish nutrition: Digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition*, *11*(2), 103-122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x>
- Lupatsch, I. (2003). Feeding Regimes for Asian Sea Bass Grown at High Temperatures. *Global Aquac Advocate*, *6*.
- Marine Harvest. (2018). *Salmon Farming Industry Handbook 2018*. Marine Harvest ASA. www.marineharvest.com/investor
- Ministerio de Medio Ambiente. (2005). *Guía de Mejores Técnicas Disponibles (MTD) en España del sector cervecero* (p. 156). Ministerio de Medio Ambiente, Gobierno de España. <https://bit.ly/3xDjuky>
- Naumowicz, K., Pajdak, J., Terech-Majewska, E., & Szarek, J. (2017). Intracohort cannibalism and methods for its mitigation in cultured freshwater fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, *27*(1), 193-208. <https://doi.org/10.1007/s11160-017-9465-2>
- Schrader, K. K., Davidson, J. W., & Summerfelt, S. T. (2013). Evaluation of the impact of nitrate-nitrogen levels in recirculating aquaculture systems on concentrations of the off-flavor compounds geosmin and 2-methylisoborneol in water and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacultural Engineering*, *57*, 126-130. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2013.07.002>
- Stone, D. A. J. (2003). Dietary Carbohydrate Utilization by Fish. *Reviews in Fisheries Science*, *11*(4), 337-369. <https://doi.org/10.1080/10641260390260884>
- Storebakken, T., & Austreng, E. (1987a). Ration level for salmonids: I. Growth, survival, body composition, and feed conversion in Atlantic salmon fry and fingerlings. *Aquaculture*, *60*(3), 189-206. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90287-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90287-0)

- Storebakken, T., & Austreng, E. (1987b). Ration level for salmonids: II. Growth, feed intake, protein digestibility, body composition, and feed conversion in rainbow trout weighing 0.5–1.0 kg. *Aquaculture*, *60*(3), 207-221. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90288-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90288-2)
- Sveier, H., & Lied, E. (1998). The effect of feeding regime on growth, feed utilisation and weight dispersion in large Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in seawater. *Aquaculture*, *165*(3), 333-345. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00269-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00269-5)
- Walde, C. S., Stormoen, M., Pettersen, J. M., Persson, D., Røsæg, M. V., & Bang Jensen, B. (2022). How delousing affects the short-term growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, *561*, 738720. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738720>
- Wilson, R. P. (1994). Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*, *124*(1), 67-80. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90363-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90363-8)

Este folio ha sido intencionadamente dejado en blanco

Sección segunda

Capítulo IV. Evaluación de la respuesta inmunitaria de la dorada (*Sparus aurata*) bajo regímenes deficitarios de alimentación



Sparus aurata (Linnaeus, 1758)

griego *sparos*, latín *sparus*, nombre de pez; latín *auratus* 'color oro', mancha amarilla en la frente (Barriuso, 1986)

Bahía de Cádiz ,2007 (Foto: A. M. Arias)

Derechos cedidos por M. Arias, www.ictioterm.es

Sección segunda:

Evaluación biológica de la valorización de subproductos de la industria cervecera en piensos para acuicultura

Capítulo IV. Evaluación de la respuesta inmunitaria de la dorada (*Sparus aurata*) bajo regímenes deficitarios de alimentación

IV.1 Resumen y objetivos

IV.2 Materiales y métodos

IV.2.1 Peces

IV.2.2 Dietas

IV.2.3 Diseño experimental

IV.2.4 Análisis estadístico

IV.3 Resultados

a) Comportamiento, canibalismo y mortalidad

b) Crecimiento

c) Parámetros inmunitarios

c.1. Parámetros de la inmunidad humoral

c.1.1) Actividad enzimática del suero

c.1.1.a) Actividad peroxidasa del suero

c.1.1.b) Actividad proteasa del suero

c.1.1.c) Actividad antiproteasa del suero

c.1.1.d) Actividad lisozima del suero

c.1.2) Actividad enzimática del moco de la piel

c.1.2.a) Actividad peroxidasa del moco de la piel

c.1.2.b) Actividad proteasa del moco de la piel

c.1.2.c) Actividad antiproteasa del moco de la piel

c.1.2.d) Actividad lisozima del moco de la piel

c.1.2.e) Cuantificación de proteínas

c.2) Parámetros de la inmunidad celular

c.2.1 Actividad peroxidasa de los leucocitos de riñón cefálico

c.2.2 Explosión respiratoria de los leucocitos de riñón cefálico

c.2.3 Actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico

d) Análisis de la expresión génica

d.1 En intestino

d.2 En piel

IV.4 Discusión

IV.5 Bibliografía

IV.1 Resumen y objetivos

La relación entre la nutrición y la salud ha sido ampliamente estudiada en acuicultura, pero no con la misma intensidad cuando a los peces se les somete a regímenes de alimentación deficitarios, por debajo de las recomendaciones nutricionales realizadas por los fabricantes de piensos, o evaluadas en estudios científicos.

Por un lado, existen numerosos estudios que buscan evaluar las ratios máximas de crecimiento de las diferentes especies en crianza ya que el objetivo del productor es maximizar el crecimiento —tanto en acuicultura como en otras ganaderías—. Por otro lado, también son habituales los estudios evalúan las ratios de decrecimiento en situaciones de inanición, buscando establecer las tasas metabólicas en reposo, etc. Pero es quizás a los regímenes de alimentación deficitaria, o sub-óptima —pero sin llegar a la inanición— a la que los estudios sobre nutrición e inmunología han prestado menor atención.

Como hemos visto en el capítulo anterior la relación equilibrada entre la ingesta, el crecimiento, y la salud de los animales puede verse comprometida por numerosos motivos. Siendo el objetivo principal de este capítulo evaluar que le sucede a una especie carnívora (*S. aurata*) cuando es alimentada de manera deficiente —en aproximadamente a un 50 % de sus necesidades energéticas, de macronutrientes (MN) y micronutrientes (mN)—, y se enfrenta a un episodio de reto bacteriana —la oportunista *Tenacibaculum soleae*—.

Así los peces de la especie dorada (*S. aurata*) de talla pequeña (peso inicial $12,86 \pm 0,28$ g) fueron alimentados 52 días (de un total de 62 días que duró la experimentación), con cuatro dietas (dos industriales y dos fabricada expofeso para el experimento) a una tasa sub-óptima por debajo del 50 % de las recomendaciones del fabricante para los piensos diseñados para la i) especie, ii) talla y iii) temperatura experimental. Y unas dietas que reiteramos no cubren (salvo una) la totalidad de los requerimientos nutricionales de la especie.

Desde el punto de vista de la inmunidad y salud de los animales en crianza la alimentación deficitaria se puede considerar un factor de riesgo alto dado el porcentaje de peces de bajo peso y talla, —teóricamente malnutridos e inmunodeprimidos— y que pueden ser una brecha desde el punto de vista sanitario (expresada en principio en una menor respuesta inmunitaria frente a diferentes patógenos, bacterias, parásitos o virus).

Reiteramos que no existen muchos estudios que hayan prestado atención a este supuesto de que se produzca una alimentación sub-óptima. Aunque esto puede suceder en todo tipo de cultivos y sistemas (jaulas marinas, estanques, etc.). Sin duda las tecnologías de alimentación cada vez están mejorando sus procesos (visión submarina, inteligencia artificial, etc.) pero la complejidad de la acuicultura vs otras ganaderías, donde la realización de todos los procesos se produce en el agua, y donde tenemos poco control sobre lo que sucede dificulta sobremanera la evaluación de cualquier parámetro de cultivo —de la ingesta, del desperdicio de alimento—, o de la necesaria e imprescindible valoración del estado nutricional e inmunitario de los animales. Del mismo modo que es conocida la dificultad de aislar ejemplares enfermos o heridos por ejemplo de un lote o acuario a diferencia de lo que sucede con otras ganaderías, pudiendo ser este factor el nicho de inicio de un brote epidémico. No se tiene constancia de que la tenacibaculosis haya sido estudiada bajo estos regímenes de alimentación deficitaria, aun siendo una enfermedad importante con cada vez mayor presencia tanto en granjas de trucha, salmón, o dorada, etc. afectando de manera similar a los centros de cultivo de todo el Mundo (Avendaño-Herrera et al., 2006; Conforto et al., 2021; Pineiro-Vidal et al., 2008).

Por lo tanto, por un lado, el objetivo principal del presente estudio fue evaluar la respuesta inmunitaria de la dorada (*S. aurata*) al someterla a regímenes alimentarios deficientes en cantidad y calidad de macronutrientes y micronutrientes aportados por diferentes dietas —tanto industriales como fabricadas para el experimento— y su respuesta inmunitaria frente a un patógeno oportunista como *T. soleae*. Por otro lado, se estableció valorar la capacidad para asimilar dietas formuladas con materias primas de bajo coste, principalmente las levaduras de desecho de la industria cervecera (62,5 %) y harinas y aceite de pescado de subproductos. En principio dietas deficientes para i) la especie, ii) la talla; y iii) la temperatura experimental. Como objetivos secundarios se estableció incrementar el conocimiento de las dietas formuladas y los ingredientes utilizados, principalmente de las levaduras de desecho que se utilizaron en la formulación de las dietas.

La evaluación de estos objetivos se realizó mediante el estudio de los parámetros clásicos de crecimiento y del estado del sistema inmunitario. Y así los peces fueron alimentados deficientemente durante dos meses, para posteriormente realizar un reto bacteriano con *T. soleae*.

IV.2 Materiales y métodos

De manera resumida se recogen los materiales y métodos particulares del experimento realizado.

IV.2.1 Peces

Ciento veinte doradas (*S. aurata*) de peso inicial $12,86 \pm 0,28$ g (n=120) se obtuvieron de una granja local ubicada en Águilas (Murcia). Los peces fueron aleatoriamente distribuidos en un sistema de recirculación de (4 y 4 tanques independientes), en total ocho tanques cilíndricos iguales y aclimatados por dos semanas antes de comenzar el experimento, durante este periodo fueron alimentados con una dieta comercial para dorada (Skretting, Burgos, España). La tasa recomendada de alimentación para esta talla y temperatura de las instalaciones es de un 3,4% diario sobre la biomasa, y según el fabricante debemos reflejar en este texto que «La tabla de alimentación es meramente orientativa».

Durante el experimento se evaluaron cuatro dietas, por duplicado, el número de peces por tratamiento o grupo fue de 30 (n=30), 15 peces por tanque. Los peces se alimentaron 52 días, de un total de 62 de duración del experimento.

Los peces se retaron el día 61 con *T. soleae* *vide infra* IV.2.3 Diseño experimental, y se tomaron las muestras biológicas 24 horas después de la inyección para comprobar el efecto a corto plazo de la exposición al patógeno *T. soleae* sobre el sistema inmunitario de los animales.

IV.2.2 Dietas

Durante el experimento se utilizaron cuatro dietas experimentales: Dieta A: Ti3 para Tilapia (Skretting, Burgos, España); Dieta B: Mar Perla L específicamente formulada para dorada, (Skretting, Burgos, España); Dieta C: Biothesan 40 y Dieta D: Biothesan 70 (Biothesan, Granada, España). Para información adicional sobre dichas dietas *vide supra* la el Capítulo II de Materiales y Métodos.

Las dietas se seleccionaron por diferentes motivos: Dieta A: bajo contenido en proteína (33,0 %) y grasas (6,5 %) y de fabricación industrial; Dieta B: dieta comercial específicamente formulada para dorada y un alto contenido en proteína y grasas (56 % y 15 % respectivamente); y las Dietas C y D por su bajo contenido en proteína y grasa (28.6 % y 6,5 %). Las dietas C y D se formularon y fabricaron de manera que su contenido nutricional fuera isoproteico, isolipídico e isoenergético.

La principal fuente de proteína de las dietas varía desde un 48,4 % de harina de pescado (de calidad indeterminada) en la dieta B; un 4,4 % de harina de pescado (de calidad indeterminada) en la Dieta A; Las dietas C y D contenían un 25 y 20 % respectivamente de harina de pescado (proveniente de desechos de conserveras y procesado de pesquerías, de baja proteína 56-58 % Proteína Bruta.), siendo su principal fuente de proteína las levaduras de desecho, dieta C (55 %) y dieta D (62,5 %) —sobre peso húmedo—. La cantidad de aceite de pescado también es variable en las dietas evaluadas, la dieta B contiene un 5,34 % de un total de un 15 % de grasas y aceites (como única fuente adicional de lípidos a la harina de pescado). La dieta A no contiene aceite de pescado, y las dietas C y D un 6,5 % de aceites de pescado reciclados provenientes de desechos del procesado de la pesca y las conserveras.

IV.2.3 Diseño experimental

Los peces fueron estabulados durante 62 días (de los que solo fueron alimentados 52). La tasa de alimentación fue de un 1,5 % de la biomasa inicial total de cada tanque, sin que esta tasa se actualizara durante la duración del experimento. Tasa de alimentación muy inferior a las recomendaciones del fabricante para la i) especie; ii) talla; y iii) temperatura experimental. Estas, tasas recomendadas, aunque son meramente orientativas, podemos establecerlas en aproximadamente de un 3,4 % para la dieta B específicamente formulada para dorada, y respecto a la dieta A (aunque es para otra especie y una temperatura más elevada) en un 5,5 %.

Después de ese periodo los peces se anestesiaron y se muestrearon aleatoriamente cinco ejemplares de cada tratamiento y por tanque (no retados, duplicado, n=10). Otros cinco ejemplares aleatoriamente por tratamiento y tanque fueron retados con *Tenacibaculum soleae* (10^7 ufc/ml) (n=10) mediante inyección intraperitoneal. La cepa de la bacteria *T. soleae* (n° CECT7292) fue cedida por el Profesor Miguel Ángel Moriñigo (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, España). La bacteria se mantuvo congelada a -80 °C hasta su uso, y fue cultivada en medio específico para este tipo de cepas, Flexibacter maritimus medium (FMM, Conda, Spain). Para la preparación del inóculo, la bacteria fue recolectada e inoculadas en 50 ml del medio durante 48 h adicionales a temperatura constante y con agitación continua. Posteriormente, la densidad de las bacterias en crecimiento exponencial se midió de acuerdo con el estándar de McFarland para ajustar la densidad a 10^8 ufc/ml. A los peces se les inyectó con 100 μ l, por lo que resulta una concentración final de 10^7 ufc/pez. El resto de los peces que no fueron retados, ni sacrificados (cinco por tanque) fueron recuperados para otros trabajos en atención a la necesaria ética y reducción (RRRs) en el uso de animales de experimentación.

Después de 24 horas expuestos al patógeno los peces fueron anestesiados y muestreados como se describen en Materiales y métodos generales. Se tomaron muestras de tejidos o sangre. entre ellas suero, moco, piel o intestino tal y como se describe en el capítulo I Materiales y métodos (*vide supra*). Las muestras de intestino y piel fueron analizadas mediante PCR cuantitativa, (qPCR) y se analizaron los siguientes genes relacionados con el sistema inmunitario: *c3*, *cox-2*, *hamp*, *igt*, *il-1 β* , *lyz*, *tc α - β* , *tnf α* , *β -def*.

El resto de muestras fueron analizadas para obtener los resultados de las actividades celulares y humorales siguiendo los métodos descritos con anterioridad.

IV.3.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos han sido representados en las gráficas y tablas correspondientes como la media \pm el error estándar (SEM) para cada parámetro medido. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS 19.0. y GrahPad Prism 9. Para calcular la normalidad de los datos previamente se realizó la prueba Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza fue verificada usando la prueba de Levene. Para comparar las medias entre muestras se realizó la prueba T de Student, y para los no normales, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (dichos datos se transformaron previamente). Las diferencias significativas entre grupos o dietas se analizaron mediante Anova factorial (cuando el número de grupos o dietas lo permitía), o alternativamente se realizó la prueba T de Student. Las pruebas Anova conllevaron un análisis post-hoc de Tukey o Games-Howell. Principalmente estas son las pruebas estadísticas realizadas para determinar las diferencias significativas entre ellas, considerando las diferencias estadísticamente significativas al 95% de nivel de confianza ($p \leq 0,05$) en todos los casos. Todas las medias se han realizado por triplicado.

IV.3 Resultados

Del crecimiento de los peces, y de los resultados de las diferentes técnicas analíticas realizadas sobre las muestras biológicas debidamente conservadas se recogen aquellos resultados que se consideran más relevantes en atención a los objetivos del experimento. Los métodos relativos a dichas técnicas se recogen en el Capítulo I. Materiales y métodos, *vide supra*.

a) Comportamiento, canibalismo y mortalidad

Durante la duración del experimento no se produjo ninguna mortalidad en los ejemplares sometidos a experimentación, ni ningún episodio de canibalismo o de agresiones, ni se apreciaron heridas, ni erosión de aletas, escamas, etc. Por lo que los peces de todos los grupos, aun recibiendo una alimentación deficitaria, se considera que estaban saciados. Este déficit en la alimentación es mayor de un 50% en cantidad para la Dieta B —expresamente formulada para dorada—. Y es aún mayor en las dietas A, C y D que tienen un contenido proporcionalmente menor en MN y mN. Así, respecto de la Dieta B (100 % óptimo): la Dieta A aporta un 57 % de la PB y un 40 % de la GB; las dietas C y D aproximadamente un 51 % de PB y respecto de las GB, la dieta C un 59 % y la D un 63, 3%.

b) Crecimiento

A partir de los datos obtenidos durante los muestreos biométricos los días 0, y 62 de peso (P), ($g \pm 0,01$) y la ración diaria proporcionada a cada grupo experimental se pudieron calcular los parámetros relativos al crecimiento de los sujetos experimentales y el aprovechamiento de la alimentación proporcionada (Tablas 8 y 9). Entre dichos parámetros no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Si es relevante poner de manifiesto que el Índice de Conversión de alimento (ICA), la tasa de eficiencia de la proteína (TEP), la eficiencia del alimento (FE), o la tasa de crecimiento específico (TCE) recogen resultados razonables para un cultivo de dorada. Aunque evidentemente el crecimiento fue lento dada la baja tasa de alimentación (1,5 % frente al 3,4 % - 5,5 % para las dietas bajas en proteína sobre la biomasa total del tanque / día recomendado). Y dado que las dietas A, C y D también tienen un contenido mucho menor en MN y mN de los recomendados para la especie y talla (datos mostrados anteriormente).

Aspecto que se refleja en el promedio de ingesta de proteína, el cual varía de la manera esperada, aunque el crecimiento en porcentaje no difiera en la misma proporción. Sin duda esto es debido a una mejor TEP de los peces alimentados con menor proteína. Así es destacable que la TEP de la dieta B (óptima en MN y mN) pero suministrada deficientemente sean similares a la TEP de la dieta D (sub-óptima en MN y mN) y que la conversión de proteína en peso de ambas dietas sea similar y cercano al 1:1, mientras que el crecimiento es como se esperaba menor en la Dieta D, ya que también lo ha sido el aporte de nutrientes. De manera inesperada las dietas A y C, aun cuando el aporte de proteína ha sido deficitario superan en un 40 % aproximadamente la TEP de la Dieta B. Lo que implica que una mayor ingesta de proteína no supone en este caso una conversión más eficiente. Así la mayor ingesta de proteína por grupo fue de 84,29 de la Dieta B frente a las ingestas de las otras dos dietas sub-óptimas (Dieta A 48,33 y de la Dieta C 38,73) ha resultado en una peor eficiencia.

Tabla 8: Índices de crecimiento y aprovechamiento del alimento durante el periodo experimental

Dieta (denom. Comercial)	ICA	% crecimiento*	IP**	TEP	FE	TCE
Dieta A (Ti3)	2,64 ± 0,90	33,44 ± 11,43	48,33 ± 4,10	1,30 ± 0,44	0,43 ± 0,15	0,47 ± 0,14
Dieta B (Mar perla L)	1,94 ± 0,00	40,18 ± 0,00	84,29 ± 1,35	0,92 ± 0,00	0,52 ± 0,00	0,56 ± 0,00
Dieta C (B40)	2,54 ± 0,47	31,83 ± 5,87	38,73 ± 1,85	1,43 ± 0,26	0,41 ± 0,08	0,46 ± 0,07
Dieta D (B70)	4,25 ± 1,52	21,04 ± 7,71	48,63 ± 3,16	0,94 ± 0,34	0,27 ± 0,10	0,32 ± 0,10

Crecimiento e índices de crecimiento de los tratamientos Dieta A, B, C y D. Valores promedio ± error estándar de la media.

No hay diferencias significativas entre los parámetros analizados ($P < 0,05$)

* % de crecimiento desde la talla inicial, no evaluado estadísticamente ** Ingesta de proteína

ICA= Índice de conversión del alimento, TEP= Tasa de eficiencia de la proteína

TCE= Tasa de crecimiento específico (En inglés SGR o *specific growth rate*)

Aunque consideramos el ICA un mal predictor de los resultados del crecimiento, debemos por poder comparar entre dietas y otros experimentos, así es necesario del mismo modo que se realizó en el anterior capítulo estandarizarlo a los mismos porcentajes de humedad estándar ICAC (8%) para una dieta extruida y considerada seca.

Tabla 9: Índices de conversión del alimento normal y corregido

Grupo	ICA	ICAC
Grupo A/Dieta A	2,64 ± 0,06	2,64
Grupo B/Dieta B	1,94 ± 0,08	1,94
Grupo C/Dieta C	2,54 ± 0,09	1,57
Grupo D/Dieta D	4,25 ± 0,01	2,63

Valores promedio ± error estándar de la media.

ICA= Índice de conversión del alimento

ICAC= Índice de conversión del alimento corregido en humedad

ICAC= $[ICA \cdot (100 - \% \text{ humedad dieta})] / (100 - 8)$

ICAC: Considerando una humedad inicial en la dieta A y B de un 8% y en C y D de 43 %

c) Parámetros inmunitarios

En los siguientes apartados se muestran los resultados de las actividades evaluadas del sistema inmunitario y que fueron analizadas en los ejemplares sujetos a experimentación. Casi todas ellas muestran significaciones estadísticas tanto entre grupos, dietas o entre los grupos de peces que fueron retados con *T. soleae* al final del periodo de experimentación.

En el caso concreto de este experimento el análisis estadístico se realizó entre las diferentes dietas y grupos:

Factor dietas (A, B, C, D, A Reto, B Reto, C Reto y D Reto), diferencias significativas mostradas con letras, idénticas letras indican que no existen diferencias significativas para esa letra y diferentes letras indican que si existen diferencias significativas entre letras. Lo que permite evaluar la diferencias entre todas ellas independientemente de si los peces fueron o no retados: no retados en adelante (PnR) y los retados (en adelante PR);

El factor dietas entre los diferentes momentos, día 61 y 24 horas post exposición a la bacteria (PnR e PR): diferencias significativas mostradas con *, igual número de asteriscos indica que hay diferencias significativas para esa dieta antes y después del reto, y la ausencia de * indica la inexistencia de diferencias, y permite evaluar las diferencias para una misma dieta antes y después de realizar el reto;

Y el Factor grupo (PnR: columnas A, B, C y D, y PR, columnas A Reto, B Reto, C Reto, D Reto) que se representa con corchetes y * sobre ellos, que permite evaluar si hay diferencias en la respuesta inmunitaria por la exposición al patógeno *T. soleae* independientemente de la dieta.

En todos los trabajos de esta tesis y por sistemática se realizaron las mismas técnicas analíticas, las cuales se exponen de manera ordenada en el mismo orden para todos los experimentos realizados. Por sistemática primero se muestran los resultados de la actividad enzimática del suero (Peroxidasa, Proteasa, Antiproteasa y Lisozima), posteriormente de la actividad enzimática del moco de la piel (Peroxidasa, Proteasa, Antiproteasa, Lisozima y la Cuantificación de proteínas). Y para finalizar los parámetros de la inmunidad celular (Peroxidasa, Explosión respiratoria y la Actividad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico).

c.1 Parámetros de la inmunidad humoral

En los siguientes apartados se muestran las actividades de la inmunidad humoral que fueron analizadas en los ejemplares sujetos a experimentación.

c.1.1 Actividad enzimática del suero

Casi todas las actividades muestran significaciones estadísticas, entre grupos, dietas, o entre los grupos de peces que fueron retados (PR) o no (PnR) con *T. soleae*.

De las actividades enzimáticas analizadas en el suero de los peces, no fue posible analizar la lisozima por carecer de volumen de muestra suficiente para realizar todas las actividades propuestas en el diseño experimental.

En general existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos de peces no retados en adelante (PnR) y los retados (en adelante PR), y la respuesta inmunitaria fue similar para todas las dietas, ya que ninguna dieta mejora o empeora considerablemente el nivel de actividad enzimática en general. En cada actividad analizada se muestran las consideraciones necesarias para entender los datos presentados.

c.1.1.a) Actividad peroxidasa del suero

En la Figura 23 se muestran los niveles de peroxidasa del suero después de un periodo de alimentación de 62 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto), tan solo existen diferencias significativas entre los niveles de actividad enzimática entre los PnR y los PR, y como se muestra en la gráfica se produce un descenso de la actividad peroxidasa en los PR independientemente de la dieta y del nivel de nutrientes aportados por estas. Los peces alimentados con la dieta A no acusa tanto ese descenso después del reto, aunque no existan diferencias significativas entre las dietas.

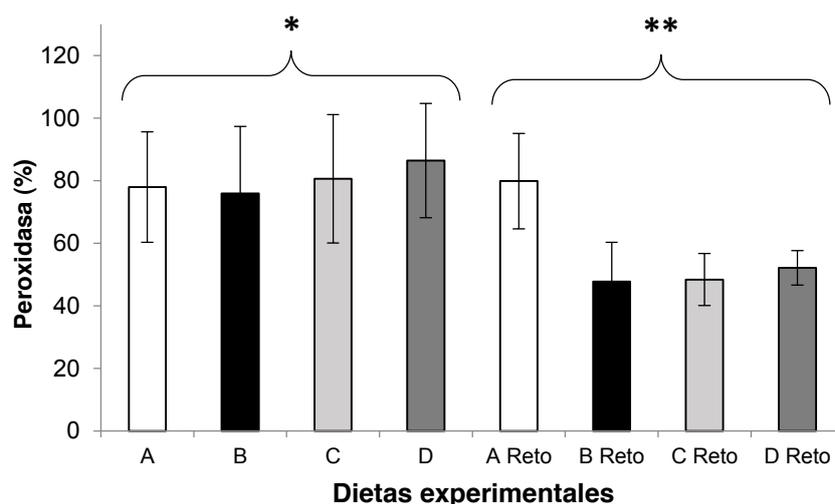


Figura 23. Niveles totales de peroxidasa en suero después de un periodo de alimentación de 62 días para los diferentes tratamientos para los peces no retados (PnR) (Dietas A; B; C; D), y los peces retados (PR) (Dietas Reto A; B; C; D) con *T. soleae*. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnR y PR (dieta e reto); los corchetes con * denotan diferencias significativas para el reto. (P < 0,05).

c.1.1.b) Actividad proteasa del suero

En la Figura 24 se muestran los niveles de proteasa del suero después de un periodo de alimentación de 62 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto), tan solo existen diferencias significativas entre los niveles de actividad enzimática entre los PnR y los PR, y como se muestra en la gráfica se produce un ascenso de la actividad proteasa en los PR independientemente de la dieta con la que se han alimentado, y del nivel de nutrientes aportados por estas. El comportamiento de la actividad proteasa si difiere entre los peces alimentados con las diferentes dietas y es mediado por el reto (mostrado con las letras a y b). Aunque los peces alimentados con la dieta A después del reto (A Reto) acusan de nuevo una mayor actividad después del reto. Al activarse la actividad proteasa para todas las dietas post reto de igual manera no existen diferencias significativas entre estas (mostrado con la letra b).

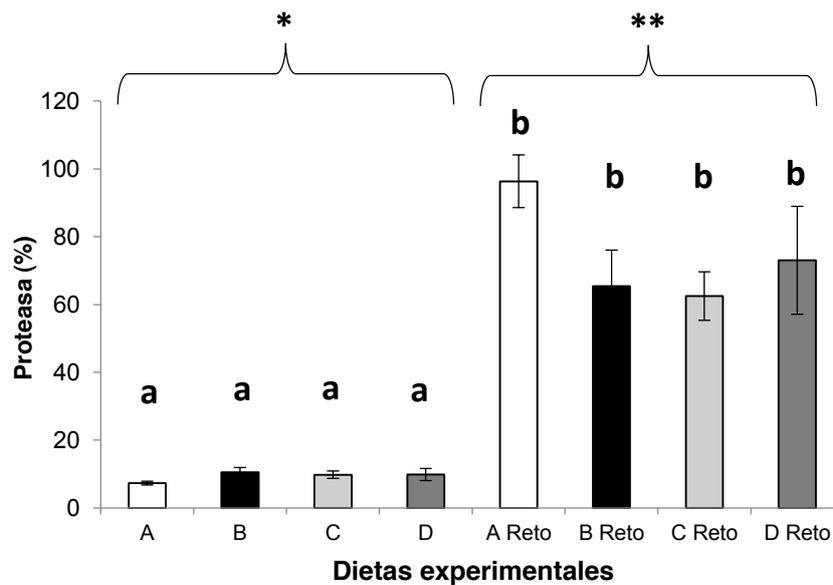


Figura 24. Niveles totales de proteasa en suero después de un periodo de alimentación de 62 días para los diferentes tratamientos para los peces no retados (PnR) (Dietas A; B; C; D), y los peces retados (PR) (Dietas Reto A; B; C; D) con *T. soleae*. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnR y PR (dieta e reto); los corchetes con * denotan diferencias significativas para el reto. (P < 0,05).

c.1.1.c) Actividad antiproteasa del suero

En la Figura 25 se muestran los niveles de antiproteasa del suero después de un periodo de alimentación de 62 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto), tan solo existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los niveles de actividad enzimática entre los peces alimentados con la dieta D menor actividad antes del reto (mostrado con la letra a) y los alimentados con las dietas A Reto y B Reto (mostrado con la letra b) dentro de los peces retados que muestran mayor actividad frente al resto. Aunque estas dietas no difieren entre sí (dietas A Reto y B Reto) (mostrado con la letra b). Como se muestra en la gráfica en general se produce un ligero ascenso de la actividad antiproteasa por motivo del reto, siendo las dietas A Reto y B Reto las que mejor respuesta muestran. A diferencia de lo que sucede con las anteriores actividades (proteasa y peroxidasa en suero) en las que no existen diferencias por motivo del reto y todos los peces con independencia de su alimentación presentan igual respuesta

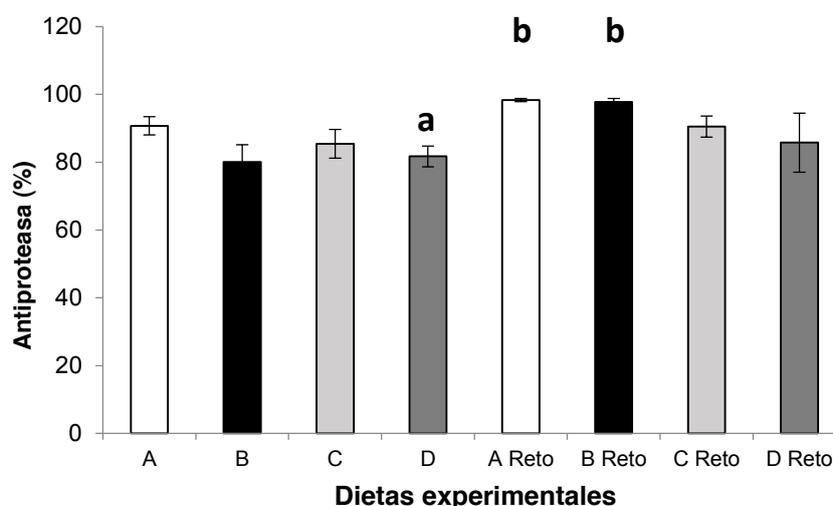


Figura 25. Niveles totales de antiproteasa en suero después de un periodo de alimentación de 62 días para los diferentes tratamientos para los peces no retados (PnR) (Dietas A; B; C; D), y los peces retados (PR) (Dietas Reto A; B; C; D) con *T. soleae*. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnR y PR (dieta e reto); los corchetes con * denotan diferencias significativas para del reto. ($P < 0,05$).

c.1.1.d) Actividad lisozima del suero

Esta actividad no fue evaluada por carecer de suficiente volumen de muestra de suero, ya que los peces eran excesivamente pequeños como para realizar todas las actividades propuestas en el diseño experimental inicial.

c.1.2) Actividad enzimática del moco de la piel

De las actividades enzimáticas analizadas del moco de la piel de los peces, se analizaron todas las actividades propuestas en el diseño experimental. De manera similar a como se ha hecho en el resto de experimentos se muestran de manera ordenada. Casi todas ellas muestran significaciones estadísticas positivas, tanto entre grupos, dietas o entre los grupos de peces que fueron retados (PR), o no (PnR) con *T. soleae*.

En general existen diferencias significativas entre los grupos de peces no retados (PnR) y los retados (PR), y la respuesta inmunitaria a diferencia de lo que sucede en las actividades medidas en suero no fue similar para todas las dietas.

También y de manera general reflejar que la respuesta del sistema inmunitario ha sido mucho más compleja que la que se ha producido en el suero si atendemos a los resultados de las actividades enzimáticas del moco de la piel (donde las principales diferencias se producen por motivo del reto, y no por las dietas), y se produce una respuesta plana al factor dieta.

Quizás mediada por la gran diferencia que existe entre los perfiles de proteína y carbohidratos de las dietas, o por los niveles sub-óptimos de alimentación de todas las dietas tanto en cantidad, como en quizás calidad. Es interesante analizar detenidamente estos resultados teniendo en cuenta que quizás que la respuesta inmunitaria del moco de la piel este más mediado por la dieta, que si lo comparamos con la repuesta observada en el suero menos mediado por las diferentes dietas.

c.1.2.a) Actividad peroxidasa del moco de la piel

En la Figura 26 se muestran los niveles de peroxidasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 62 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto), Existen diferencias significativas entre todos los factores, en primer lugar, entre los peces PI y PnR, y entre las dietas. Los niveles de actividad enzimática del moco de la piel de los peces alimentados con las dietas B, C y D después del reto presentan un marcado ascenso. Mientras que no sucede lo mismo en los niveles de los peces alimentados con la dieta A, bajos antes (dieta A) y después del reto (dieta A Reto) aunque si existen diferencias que se representan con *, antes y después del reto. La cual mantiene los niveles previos al reto (letra a). Mientras que la respuesta de los peces alimentados con las dietas B, C, y D después del reto es similar (letra b).

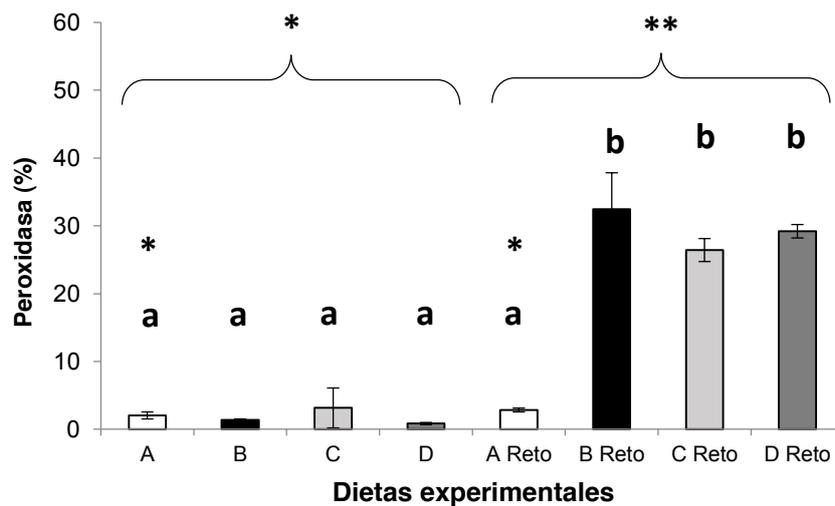


Figura 26. Niveles totales de peroxidasa en moco de la piel después de un periodo de alimentación de 62 días para los diferentes tratamientos para los peces no retados (PnR) (Dietas A; B; C; D), y los peces retados (PR) (Dietas Reto A; B; C; D) con *T. soleae*. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnR y PI (dieta e reto); los corchetes con * denotan diferencias significativas para el reto. (P <0,05).

c.1.2.b) Actividad proteasa del moco de la piel

En la Figura 27 se muestran los niveles de proteasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 62 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto). Existen diferencias significativas entre todos los factores, en primer lugar, entre los peces PI y PnR, y entre los peces alimentados con las diferentes dietas.

Siendo una respuesta compleja la que se ha producido. En primer lugar, los niveles de actividad enzimática del moco de la piel difieren entre los PI y los PnR, mostrando produce un marcado descenso de la actividad enzimática después del reto. En segundo lugar, resaltar que los peces alimentados con las dietas A y D antes del reto mostraban niveles de actividad superiores (letra a), frente a los alimentados con la dieta C (letra b) y los peces alimentados con la dieta B (letra bc). Ya que la actividad de los peces alimentados con dieta B no difieren de los peces alimentados con las dietas A, B y C (Reto) (letra cd) después del reto. Y si con niveles de actividad enzimática de los peces alimentados con la dieta D post reto (letra d). El comportamiento de la actividad enzimática antes y después del reto difiere entre los peces alimentados con las diferentes dietas, así A y D presentan un mayor nivel de actividad (denotado con *) frente a B y D (**), y post reto donde los peces alimentados con la dieta A mantienen un mejor nivel (*), los alimentado con las dietas B y C (**), y por último los peces alimentados con la dieta D (***) también presentan diferencias significativas con los anteriores.

Estos peces alimentados con la dieta D son los que muestran un mayor descenso en general de los valores de la actividad enzimática entre antes y después del reto. Actividad que era superior antes del reto y que decrece considerablemente hasta ofrecer la peor respuesta.

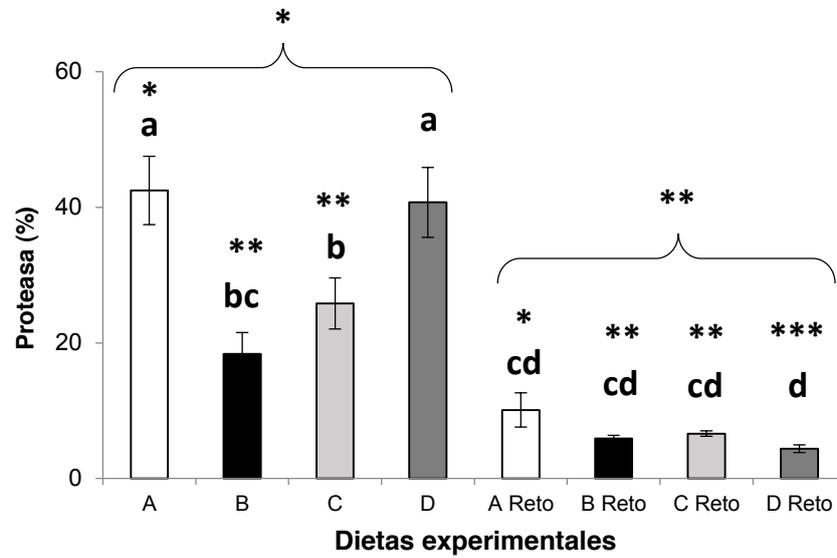


Figura 27. Niveles totales de proteasa en moco de la piel después de un periodo de alimentación de 62 días para los diferentes tratamientos para los peces no retados (PnR) (Dietas A; B; C; D), y los peces retados (PR) (Dietas Reto A; B; C; D) con *T. soleae*. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnR y PI (dieta e reto); los corchetes con * denotan diferencias significativas para el reto. (P <0,05).

c.1.2.c) Actividad antiproteasa del moco de la piel

En la Figura 28 se muestran los niveles de antiproteasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 62 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto), Tan solo existen diferencias significativas entre los peces retados y los no retados ya que estos últimos en general muestran un mayor nivel de actividad enzimática. No existen diferencias entre los peces alimentados con las diferentes dietas, ni antes y después del reto.

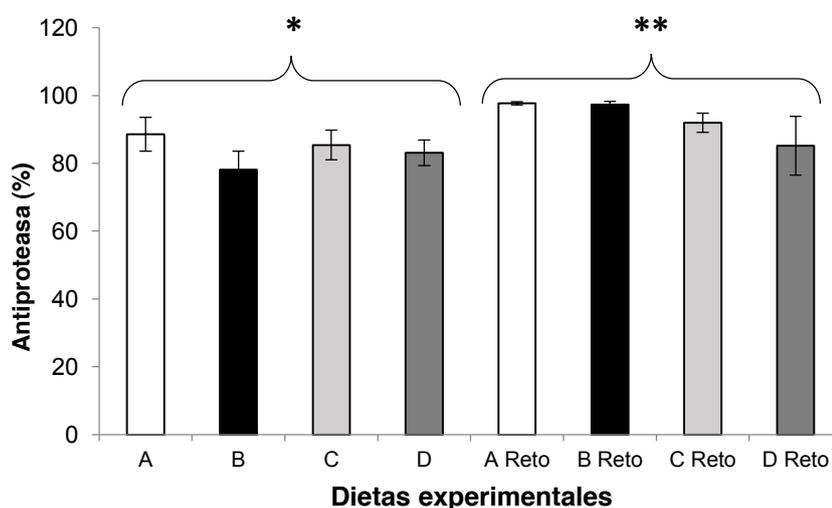


Figura 28. Niveles totales de antiproteasa en moco de la piel después de un periodo de alimentación de 62 días para los diferentes tratamientos para los peces no retados (PnR) (Dietas A; B; C; D), y los peces retados (PR) (Dietas Reto A; B; C; D) con *T. soleae*. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnR y PI (dieta e reto); los corchetes con * denotan diferencias significativas para el reto. (P < 0,05).

c.1.2.d) Actividad lisozima del moco de la piel

En la Figura 29 se muestran los niveles de lisozima del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 62 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto), Al contrario, con lo que sucede con casi todas las actividades enzimáticas analizadas los niveles de actividad de la lisozima, aun siendo superiores en los peces retados (frente a los no retados) no presentan diferencias significativas entre ambas situaciones. Quizás porque los niveles de lisozima varían poco en general entre un mínimo de 5,20 $\mu\text{g/ml}$ y un máximo de 6,75 $\mu\text{g/ml}$ equivalente de actividad HEWL. Por el contrario, la estadística si refleja diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los peces alimentados con las diferentes dietas (letras: a, ab, abc, d y abde). Por lo que los peces de las dietas A, B, C y D y D Reto ofrecen resultados similares (letra a). Los peces de las dietas A, B, C, y D después del reto también ofrecen resultados similares (letra d). Y los peces de las dietas B y D (antes y después del reto) ofrecen resultados similares (letra b). Mientras que los peces de la dieta D difieren entre sí, antes y después del reto (letras c y e). Antes y después del reto las diferencias significativas tan solo se muestran entre los peces alimentados con las dietas A (*) que difiere de la dieta D (**), y después del reto los peces alimentados con las dietas (A Reto y B Reto) también se diferencian, respectivamente (* y **).

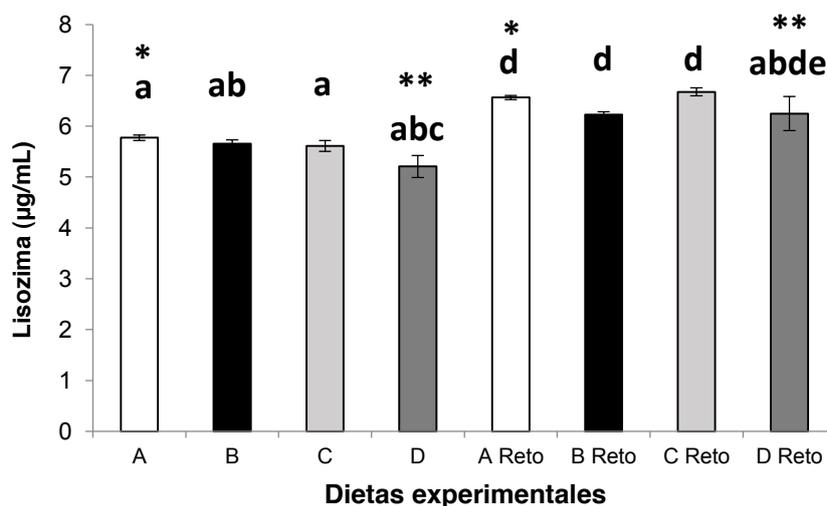


Figura 29. Niveles totales de lisozima en moco de la piel después de un periodo de alimentación de 62 días para los diferentes tratamientos para los peces no retados (PnR) (Dietas A; B; C; D), y los peces retados (PR) (Dietas Reto A; B; C; D) con *T. soleae*. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnR y PI (dieta e reto); los corchetes con * denotan diferencias significativas para el reto. ($P < 0,05$).

c.1.2.e) Cuantificación de proteínas en el moco de la piel

En la Figura 30 se muestran los niveles de proteína del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 62 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto). En esta cuantificación se vuelve a apreciar el patrón de las restantes actividades ya que la cantidad de proteína en moco de la piel aumenta después del reto, aproximadamente de 0,86 mg/mL a 1,36 mg/mL valores promedio entre los niveles altos (PR) y bajos (PnR). Siendo superiores en los peces retados (frente a los no retados). Salvo para los peces alimentados con la dieta D que ya mostraban valores muy superiores al resto de dietas antes del reto.

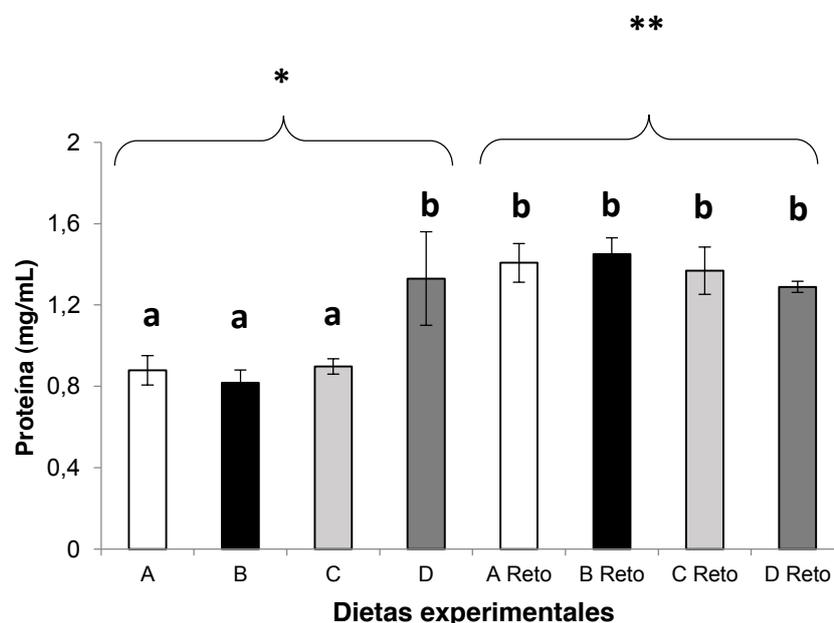


Figura 30. Niveles totales de proteína en moco de la piel después de un periodo de alimentación de 62 días para los diferentes tratamientos para los peces no retados (PnR) (Dietas A; B; C; D), y los peces retados (PR) (Dietas Reto A; B; C; D) con *T. soleae*. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnR y PI (dieta e reto); los corchetes con * denotan diferencias significativas para el reto. (P < 0,05).

c.2) Parámetros de la inmunidad celular

En los siguientes apartados se muestran las actividades de la inmunidad humoral que fueron analizadas en los ejemplares sujetos a experimentación. En general, en la evaluación de la inmunidad celular se repite el patrón que ya hemos puesto de manifiesto durante los apartados anteriores sobre la inmunidad humoral.

Y aunque existen algunas diferencias estadísticas entre los peces alimentados con las diferentes dietas, el principal patrón son las diferencias causadas por el reto. El siguiente patrón que se repite es una activación de los niveles de la inmunidad celular con una peor respuesta de la dieta D Reto, es decir la dieta D después del reto.

c.2.1 Actividad peroxidasa de los leucocitos de riñón cefálico

En la Figura 31 se muestra la actividad peroxidasa de los leucocitos de riñón cefálico después de un periodo de alimentación de 62 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto), En esta cuantificación se vuelve a apreciar el patrón de las restantes actividades ya que la cantidad de actividad en los PR es mayor, excepto para los peces alimentados con la dieta D que mantiene los niveles antes del reto (diferencia mostrada con corchetes y *, **). Respecto a los peces alimentados con las dietas, aun siendo los niveles pre-reto similares para los peces de la dieta A (letra a) similares a los de la dieta D pre y post reto (letra a), su respuesta ante la exposición a la bacteria iguala a los de las dietas B y C (letra ab) que mantenían niveles algo más altos, pero sin ser significativos estadísticamente. Así la respuesta de los peces de estas dietas después de la exposición a la bacteria A, B y C se igualan (letra bd). No así sucede con los peces de la dieta D que antes y después reiteramos muestran menor actividad peroxidasa significativamente diferente (*) con el resto de las dietas antes y después del reto.

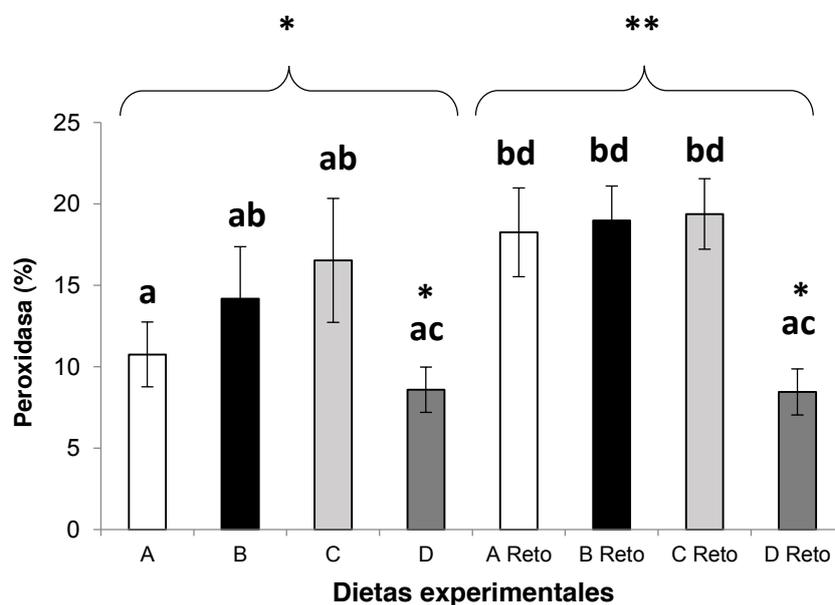


Figura 31. Niveles de actividad peroxidasa en leucocitos del riñón cefálico después de un periodo de alimentación de 62 días para los diferentes tratamientos para los peces no retados (PnR) (Dietas A; B; C; D), y los peces retados (PR) (Dietas Reto A; B; C; D) con *T. soleae*. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnR y PI (dieta e reto); los corchetes con * denotan diferencias significativas para el reto. (P <0,05).

c.2.2 Explosión respiratoria de los leucocitos de riñón cefálico

En la Figura 32 se muestra la explosión respiratoria de los leucocitos del riñón cefálico después de un periodo de alimentación de 62 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto), En esta cuantificación se vuelve a apreciar el patrón de las restantes actividades evaluadas ya que la cantidad de actividad en los PR es mayor. Mayor excepto para los peces alimentados con la dieta D en los que se produce un descenso respecto a los niveles antes del reto (diferencia mostrada con corchetes y *, **). Respecto a los peces alimentados con la Dieta D antes y después de la exposición a la bacteria los niveles expresados de explosión respiratoria son similares y se encuentran por debajo del promedio de los demás grupos (diferencia mostrada con *). En general la respuesta de los peces alimentados con las dietas A, B y C (letra a) es similar y estadísticamente significativa ($P < 0,05$) aumentando después de la exposición a la bacteria *T. soleae* (A Reto, B Reto, C Reto; letra b). Y como hemos mencionado anteriormente la respuesta de los peces alimentados con la dieta D es errática y no se produce después del reto (letra a, para D y D Reto).

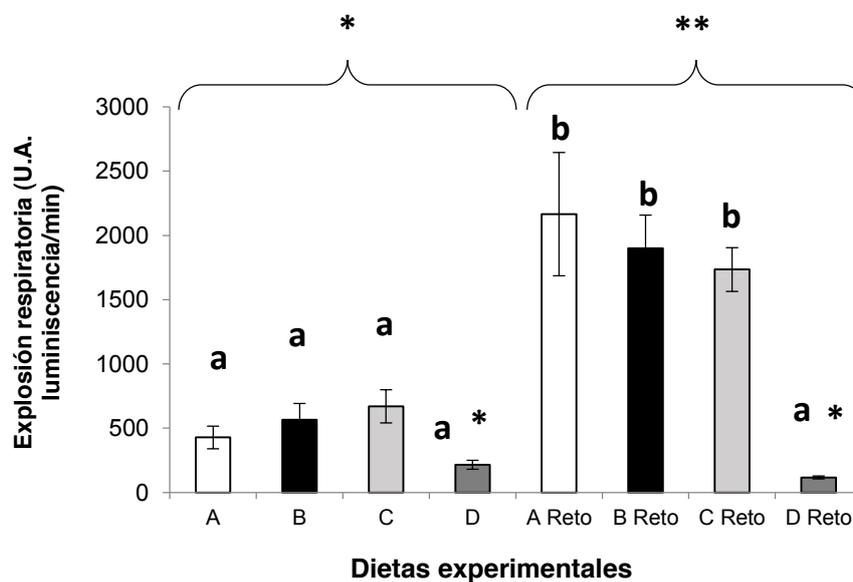


Figura 32. Niveles de explosión respiratoria en leucocitos del riñón cefálico después de un periodo de alimentación de 62 días para los diferentes tratamientos para los peces no retados (PnR) (Dietas A; B; C; D), y los peces retados (PR) (Dietas Reto A; B; C; D) con *T. soleae*. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnR y PI (dieta e reto); los corchetes con * denotan diferencias significativas para el reto. ($P < 0,05$).

c.2.3 Actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico

La habilidad fagocítica se define como el porcentaje de células de levaduras marcadas (con FITC) con una o más bacterias ingeridas dentro de la población celular fagocítica, mientras que la capacidad fagocítica se define como la intensidad media de fluorescencia. En la Figura 33 se muestran los valores de la capacidad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico, así como en la Figura 34, los valores de la habilidad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico.

La respuesta de ambas actividades es similar, para todos los peces alimentados con las dietas independientemente de la alimentación sub-óptima recibida. Así, se repite el patrón de ascenso post exposición a la bacteria de la capacidad fagocítica y de la habilidad fagocítica para los peces alimentados con las dietas A, B, C y D, diferencia significativa ($P < 0,05$) que se muestra con corchetes y *, **. La respuesta de los peces alimentados con las dietas resulta similar o en bloque, no existiendo diferencias entre dietas salvo en la habilidad fagocítica de los peces alimentados con la dieta C que ya era alta antes del reto Fig. 34 (letra b) para el nivel de los peces alimentados con las demás dietas (A, B y D). Por lo demás, los niveles de capacidad fagocítica (Fig. 33) y habilidad (Fig. 34) de los leucocitos de riñón cefálico de los peces alimentados con las restantes dietas es similar y denota diferencias significativas ($P < 0,05$) para los peces antes PnR (letra a) y después del reto bacteriano PR (letra b).

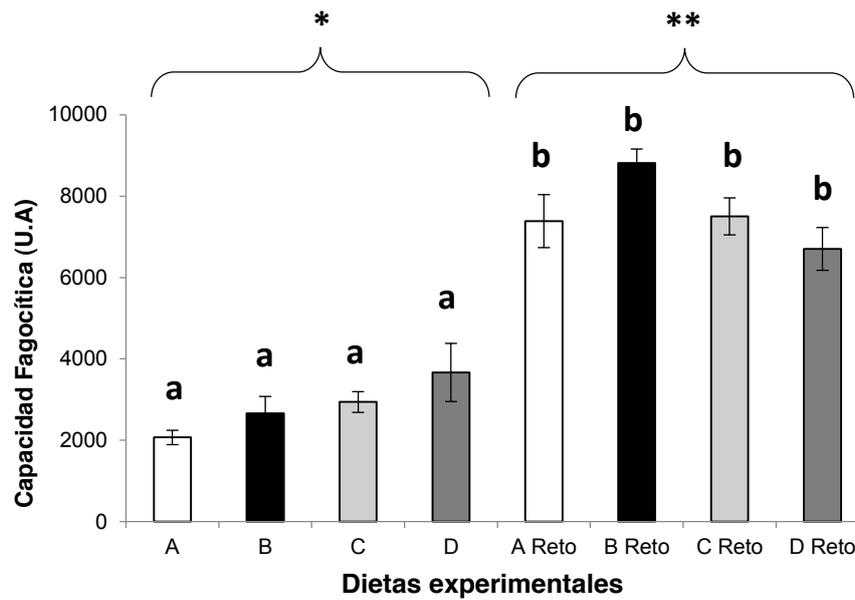


Figura 33. Niveles de capacidad fagocítica en leucocitos del riñón cefálico después de un periodo de alimentación de 62 días para los diferentes tratamientos para los peces no retados (PnR) (Dietas A; B; C; D), y los peces retados (PR) (Dietas Reto A; B; C; D) con *T. soleae*. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnR y PI (dieta e reto); los corchetes con * denotan diferencias significativas para el reto. (P <0,05).

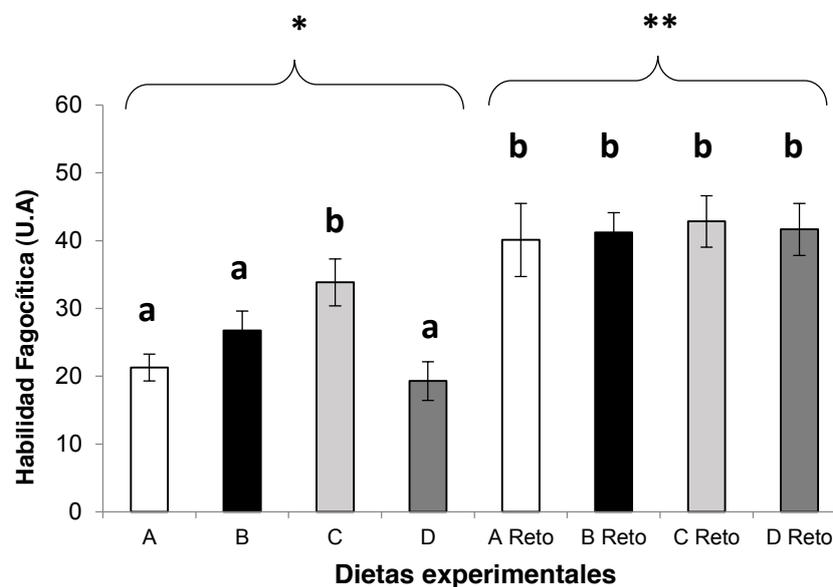


Figura 34. Niveles de habilidad fagocítica en leucocitos del riñón cefálico después de un periodo de alimentación de 62 días para los diferentes tratamientos para los peces no retados (PnR) (Dietas A; B; C; D), y los peces retados (PR) (Dietas Reto A; B; C; D) con *T. soleae*. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnR y PI (dieta e reto); los corchetes con * denotan diferencias significativas para el reto. (P <0,05).

d) Análisis de la expresión génica

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para los diferentes genes analizados, primero se muestran los resultados de los análisis obtenidos en intestino y piel. Los genes del sistema inmunitario analizados fueron los siguientes: *c3*, *cox-2*, *hamp*, *igt*, *il-1 β* , *lyz*, *tc α - β* , *tnf α* , *β -def*.

Del mismo modo que la inmunidad humoral y la inmunidad celular, la expresión génica de los genes del sistema inmunitario analizados muestra un claro patrón ascendente post reto independientemente del factor dieta, y de reiteramos sus deficiencias nutricionales en cantidad y calidad.

En el caso de los resultados sobre intestino, los valores de los genes (*cox-2* y *tc α - β*) de los peces alimentados con la dieta D presenta alguna regulación a la baja frente a la dieta B. O de una regulación a la baja en el caso del gen *hamp* de los peces alimentados con las dietas A, C y D frente a los peces alimentados con la dieta B. O, en el caso del gen *c3* de una regulación a la baja de los peces alimentados con la dieta C frente a las dietas industriales (A y B).

En el caso de la expresión génica en la piel la tendencia es clara y muestra una regulación a la baja para los valores de los genes de los peces alimentados con todas las dietas (B, C y D) frente a los peces alimentados con la dieta A, dieta que produce una mejor respuesta inmunitaria. Siempre teniendo en cuenta que todos los resultados son regulados de manera creciente por el factor reto o exposición al patógeno.

Así en los apartados siguientes, d.1 y d.2 Figuras 35 y 36 se muestran los datos analizados para la expresión génica intestino y piel.

d.1 Análisis de la expresión génica en intestino

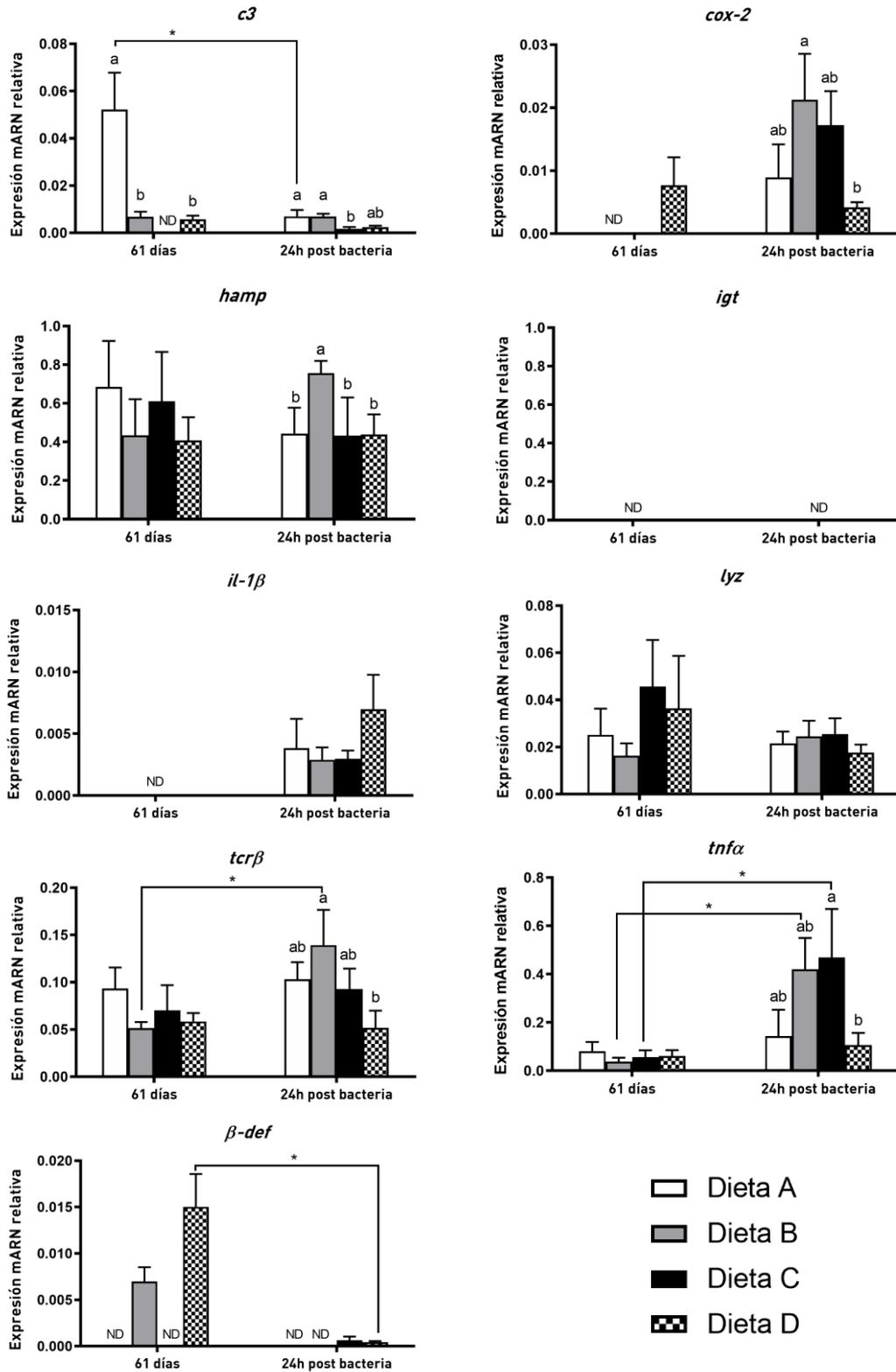


Figura 35. Análisis de la expresión génica en intestino. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta); * denota diferencias significativas entre el tratamiento (dieta) antes y después del reto ($P < 0,05$).

d.2 Análisis de la expresión génica en piel

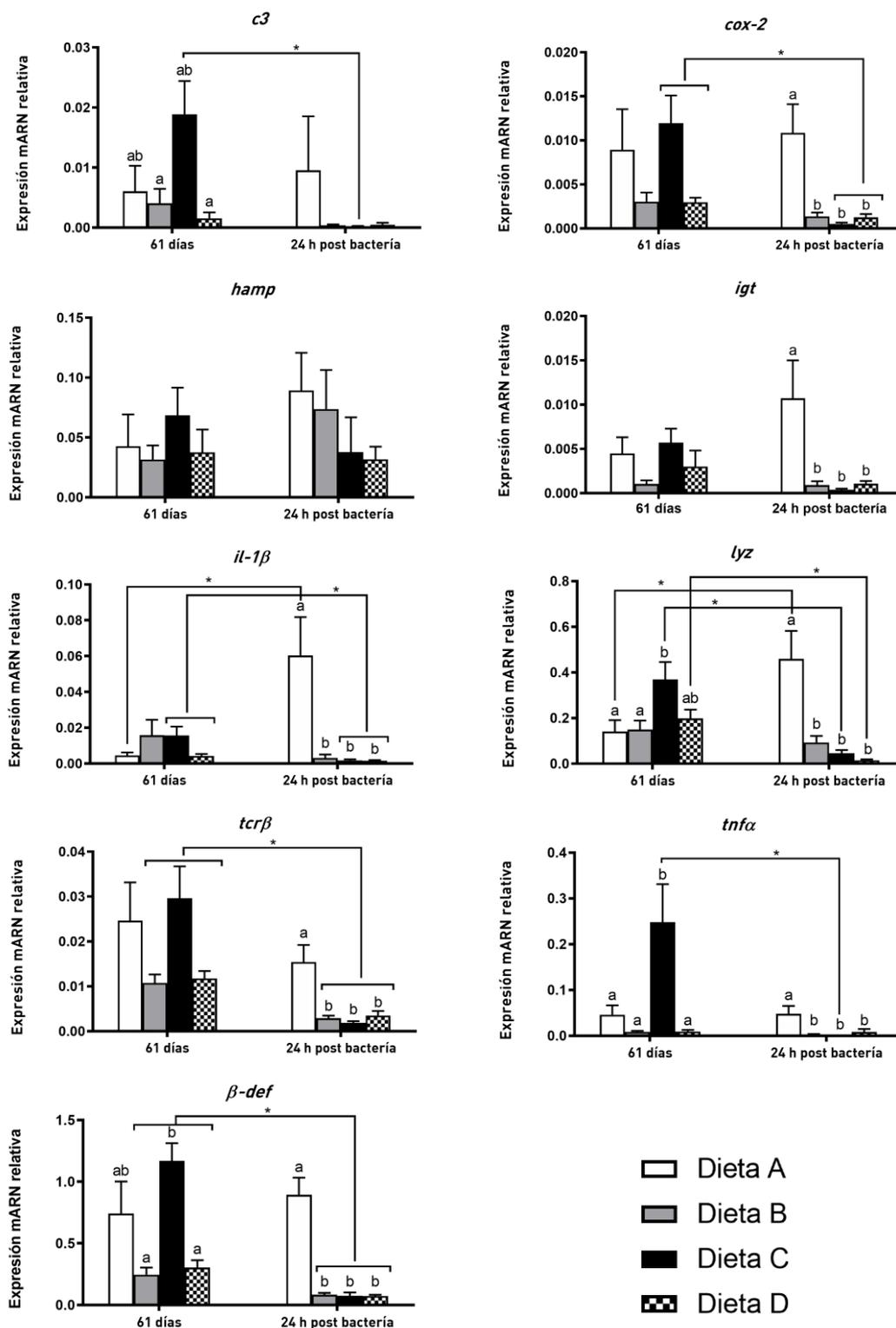


Figura 36. Análisis de la expresión génica en piel. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta); * denota diferencias significativas entre el tratamiento (dieta) antes y después del reto (P < 0,05).

IV.4 Discusión

El reto de asegurar una ingesta adecuada en cantidad de unas dietas en principio formuladas adecuadamente para la especie, y que deberían aportar tanto los nutrientes como la energía necesaria para que se produzca el crecimiento esperado (Goddard, 1996) recae en parte sobre la labor diaria y de manejo de la granja, pero la evaluación de ese desequilibrio puede realizarse desde la inmunología, la nutrición y la economía, puesto que en definitiva la mala distribución del alimento, su uso, y su contraparte desperdicio suponen una merma en la eficiencia de la rentabilidad de las empresas (Llorente, 2013; Llorente et al., 2020; Llorente & Luna, 2016).

De los resultados obtenidos en el experimento debemos diferenciar por su naturaleza en dos partes. La primera parte o relativa a la inmunidad humoral y celular, y una segunda relativa a la expresión génica.

Respecto de la inmunidad humoral y celular quizás la respuesta de los peces alimentados con la dieta C haya sido la mejor frente a la tenacibaculosis, y en general, todas las dietas permiten a los peces responder con éxito ante el reto bacteriano por *T. solea* aun habiéndose suministrado a los peces de manera deficiente (simulando una condición habitual en la crianza en el que no todos los ejemplares acceden a la alimentación en las mismas cantidades).

Como hemos comentado durante la presentación de los resultados el factor dieta no influye de la misma medida que la exposición a la bacteria patógena *T. soleae*. Y las diferencias debidas al factor dieta en casi todas las actividades enzimáticas analizadas son escasas —tanto en el suero como en el moco de la piel—y la respuesta inmunitaria de los peces en general ha sido buena y tendente a proteger del reto. Aun siendo tan diferentes las dietas en el origen y composición de sus materias primas, grado de humedad y sobre todo entre la dieta A industrial y las dietas C y D fabricadas en el laboratorio. Siendo la mayor diferencia entre la composición de estas dietas la sustitución del ELN (alto en A) por humedad en las dietas C y D. Lo que implica también un aporte energético diferente y mucho más bajo en las dietas C y D.

Salvo la peroxidasa en suero, y la proteasa en moco de la piel que descienden sus niveles post reto, el resto de niveles de la actividad enzimática aumenta. Estas actividades se

comportan justo de manera contraria a lo que sucede con la peroxidasa en moco de la piel y la proteasa en suero, en el que los niveles de actividad aumentan.

Así la exposición de los peces a la bacteria *T. soleae* hace que estos presenten unos mayores niveles de actividad enzimática (en suero y en moco de la piel), como en general también para los parámetros de la inmunidad celular —y en cierto modo era esperable—. Así la actividad peroxidasa, explosión respiratoria y actividad fagocítica (tanto capacidad como habilidad) de los leucocitos de riñón cefálico muestran estos resultados ascendentes de manera similar a las anteriores actividades de la inmunidad humoral analizadas —salvo reiteramos para la peroxidasa en suero y la proteasa en moco de la piel que descienden después del reto—. Actividades que tienen la tendencia justo contraria en su contraparte del moco de la piel, y el suero, así la peroxidasa del moco muestra unos valores mucho más elevados después del reto, y la proteasa en suero también muestra esos valores muchos más elevados.

Respecto a los análisis de la expresión génica podemos concluir que la expresión de la mayoría de los genes evaluados en la piel aumenta con la dieta A, y de manera interesante no hay diferencias entre las dietas B, C y D que tienen un contenido proteico y unos niveles de grasas diferentes (tanto en calidad como en cantidad). Recordemos un A, un 33 %, B un 56 % para las dietas industriales de Skretting, y un 28,6 % para las últimas dos dietas C y D producidas para el experimento. Así, parece que de algún modo las dietas A, C y D consiguen aportar los requerimientos esenciales para las células del sistema inmunitario, aun teniendo contenidos muy diferentes en MN y mN.

Mientras que por un lado la dieta B —industrial— si se considera óptima para las condiciones experimentales, por otro lado, los tratamientos o dietas A, C y D son deficitarias en MN y mN para i) la especie; ii) la talla; y iii) las temperaturas experimentales. Así, todas las dietas se administraron de manera deficiente (1,5 % sobre la biomasa frente al 3,4 % - 5,5 % recomendado por el fabricante). Aun bajo un régimen de alimentación teóricamente deficitario para los animales, y por debajo del 50 % de lo recomendado según «tablas» en cantidad y calidad, todos los animales independientemente del tratamiento han sido capaces de mostrar una respuesta al alza tanto de las actividades analizadas de la inmunidad humoral como de la inmunidad celular. Excepto las actividades peroxidasa en suero y proteasa en moco que muestran un patrón decreciente post exposición al patógeno.

El mayor aumento de la expresión de los genes del sistema inmunitario en la piel y el intestino por parte de los peces alimentados con la dieta A, puede deberse al contenido en carbohidratos de diferentes fuentes, lo cual es difícil de precisar solo con este estudio. Lo cual podría estar en línea con gran parte de las investigaciones del Grupo de Investigación en el que se ha desarrollado el trabajo, y según las cuales el uso de determinados extractos de plantas, semillas y/o subproductos de la industria agrícola podrían significativamente mejorar la protección e inmunidad de los peces al serles suministrados con la dieta (Ángeles Esteban, 2012; García Beltrán et al., 2017; Guardiola et al., 2016, 2018; Hoseinifar et al., 2015; Mansour et al., 2018). Para obtener mayores conclusiones sobre ese incremento se debería caracterizar aún mejor la composición de la dieta A.

Del mismo modo la respuesta satisfactoria de las dietas C y D está relacionada con la inclusión de levaduras y sus componentes a través de la alimentación, principalmente los β -glucanos de la pared celular de estas y que de manera satisfactoria se han ensayado con anterioridad por este mismo Grupo de Investigación (de Mattos et al., 2019; Ortuño et al., 2002; Reyes-Becerril et al., 2008, 2017; Rodríguez et al., 2003), o se han ensayado con diferente éxito en la alimentación desde larvas (Coutteau et al., 1990) hasta peces en la fase de engorde (Castro et al., 2013; Oliva-Teles & Gonçalves, 2001). Situación que puede variar al exceder de un determinado porcentaje de inclusión de levaduras como reemplazo del «estándar de oro» de las dietas para acuicultura que no olvidemos es la harina de pescado de alta calidad y que suele ir también complementada con altos niveles de energía provenientes de otras grasas, y ácidos grasos de alta calidad producto de la reducción de pesquerías y aportados en parte por estas harinas, y en parte por los aceites de pescado. Sin embargo, las dietas C y D en principio solo contienen subproductos de la pesca frente a una calidad indeterminada de la dieta de Skreeting, y no está de más recordar la gran variabilidad de este tipo de materias primas que pueden variar hasta en un 20-25 % su nivel de proteína (Aksnes et al., 1997). O que puede ser suplementada con otras harinas también de pesquerías o hidrolizados del mismo origen, como el calamar o el krill (Hansen et al., 2011; Olsen et al., 2006; Storebakken, 1988; Torrecillas et al., 2021; Wei et al., 2019).

Quizás la respuesta de la dieta C haya sido la mejor frente a la tenacibaculosis, aunque resulta difícil de precisar, y aunque la respuesta inmunitaria de todas las dietas en general ha sido buena y tendente a proteger del reto, esta dieta recordemos es mucho menos densa en recursos MN y mN, y aun así no ha habido diferencias en el aprovechamiento del

alimento ni el crecimiento. Por lo que con menos «alimento» la respuesta inmunitaria ha sido similar.

Estos resultados llevan a preguntarnos si las actuales dietas industriales pueden estar subestimadas/sobreestimadas y aportan un exceso de macro nutrientes que no tiene por qué ser beneficioso para la salud de los peces. No se puede ocultar nuestra intención al reducir tanto las tasas de alimentación y la calidad del alimento de demostrar que a estos niveles sub-óptimos se les iba a imposibilitar a los animales mostrar una respuesta inmunitaria adecuada. Mientras que los resultados nos confirman lo contrario, y esta respuesta inmunitaria se produce, y la dieta, calidad y cantidad no influye en la medida que se esperaba.

Cabe también preguntarse cómo funcionarían estas dietas frente a la inflamación (Campos-Sánchez et al., 2021; Campos-Sánchez & Esteban, 2021), o las heridas (Ceballos-Francisco et al., 2018, 2020; Chen, Ceballos-Francisco, Guardiola, & Esteban, 2020; Chen, Ceballos-Francisco, Guardiola, Huang, et al., 2020).

Lo cierto es que estos resultados abren un prometedor futuro a las dietas basadas en levaduras de desecho, ya que tanto por su coste, como por sus cualidades pueden suplir las necesidades nutricionales e inmunitarias de los peces suponiendo una alternativa factible a las harinas de pescado.

IV.5 Bibliografía

- Aksnes, A., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Vergara, J. M., & Montero, D. (1997). Influence of fish meal quality and feed pellet on growth, feed efficiency and muscle composition in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, *153*(3), 251–261. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00046-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00046-X)
- Ángeles Esteban, M. (2012). An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. *ISRN Immunology*, *2012*, 1–29. <https://doi.org/10.5402/2012/853470>
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A., & Magariños, B. (2006). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: A review. *Diseases of Aquatic Organisms*, *71*, 255–266. <https://doi.org/10.3354/dao071255>
- Baracos, V. E., Whitmore, W. T., & Gale, R. (1987). The metabolic cost of fever. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *65*(6), 1248–1254. <https://doi.org/10.1139/y87-199>
- Campos-Sánchez, J. C., & Esteban, M. Á. (2021). Review of inflammation in fish and value of the zebrafish model. *Journal of Fish Diseases*, *44*(2), 123–139. <https://doi.org/10.1111/jfd.13310>
- Campos-Sánchez, J. C., Guardiola, F. A., García Beltrán, J. M., Ceballos-Francisco, D., & Esteban, M. Á. (2021). Effects of subcutaneous injection of λ/κ -carrageenin on the immune and liver antioxidant status of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Fish Diseases*, *44*(9), 1449–1462. <https://doi.org/10.1111/jfd.13452>
- Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Coutinho, F., Pousão-Ferreira, P., Brandão, T. M., Oliva-Teles, A., & Peres, H. (2013). Digestive enzymes of meagre (*Argyrosomus regius*) and white seabream (*Diplodus sargus*). Effects of dietary brewer's spent yeast supplementation. *Aquaculture*, *416–417*, 322–327. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.042>
- Ceballos-Francisco, D., Castillo, Y., De La Rosa, F., Vázquez, W., Reyes-Santiago, R., Cuello, A., Cuesta, A., & Esteban, M. Á. (2020). Bactericidal effect on skin mucosa of dietary guava (*Psidium guajava* L.) leaves in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*). *Journal of Ethnopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112838>
- Ceballos-Francisco, D., Guardiola, F. A., Cordero, H., Cuesta, A., & Esteban, M. Á. (2018). Humoral immune parameters in serum of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) after induced skin injury. *Fish & Shellfish Immunology*, *75*, 291–294. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.017>
- Chen, Z., Ceballos-Francisco, D., Guardiola, F. A., & Esteban, M. Á. (2020). Influence of skin wounds on the intestinal inflammatory response and barrier function: Protective role of dietary *Shewanella putrefaciens* SpPdp11 administration to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, *99*, 414–423. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.022>
- Chen, Z., Ceballos-Francisco, D., Guardiola, F. A., Huang, D., & Esteban, M. Á. (2020). Skin wound healing in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed diets supplemented with arginine. *Fish & Shellfish Immunology*, *104*, 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.06.026>
- Conforto, E., Vilchez-Gomez, L., Parrinello, D., Parisi, M. G., Esteban, M. Á., Cammarata, M., & Guardiola, F. A. (2021). Role of mucosal immune response and histopathological study in European eel (*Anguilla anguilla* L.) intraperitoneal challenged by *Vibrio anguillarum* or *Tenacibaculum soleae*. *Fish & Shellfish Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.05.011>

- Coutteau, P., Lavens, P., & Sorgeloos, P. (1990). Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets: Artemia as a case study. *Journal of the World Aquaculture Society*, 21(1), 1–9.
- Covert, J. B., & Reynolds, W. W. (1977). Survival value of fever in fish. *Nature*, 267(5606), 43–45. <https://doi.org/10.1038/267043a0>
- de Mattos, B. O., López-Olmeda, J. F., Guerra-Santos, B., Ruiz, C. E., García-Beltrán, J. M., Ángeles-Esteban, M., Sánchez-Vázquez, F. J., & Fortes-Silva, R. (2019). Coping with exposure to hypoxia: Modifications in stress parameters in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed spirulina (*Arthrospira platensis*) and brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Fish Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00677-8>
- García Beltrán, J. M., Espinosa, C., Guardiola, F. A., & Esteban, M. Á. (2017). Dietary dehydrated lemon peel improves the immune but not the antioxidant status of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 64, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.042>
- Goddard, S. (1996). Feeding Methods. In S. Goddard (Ed.), *Feed Management in Intensive Aquaculture* (pp. 117–138). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1173-7_7
- Guardiola, F. A., Barroso, C., Enes, P., Couto, A., Díaz-Rosales, P., Afonso, A., Kanashiro, E., Peres, H., Matos, E., Oliva-Teles, A., Pousão-Ferreira, P., & Costas, B. (2018). Humoral and mucosal immune responses in meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles fed diets with varying inclusion levels of carob seed germ meal. *Fish & Shellfish Immunology*, 79, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.027>
- Guardiola, F. A., Porcino, C., Cerezuela, R., Cuesta, A., Faggio, C., & Esteban, M. A. (2016). Impact of date palm fruits extracts and probiotic enriched diet on antioxidant status, innate immune response and immune-related gene expression of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology*, 52, 298–308. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.152>
- Hansen, J. Ø., Shearer, K. D., Øverland, M., Penn, M. H., Krogdahl, Å., Mydland, L. T., & Storebakken, T. (2011). Replacement of LT fish meal with a mixture of partially deshelled krill meal and pea protein concentrates in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 315(3–4), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.038>
- Hoseinifar, S. H., Khalili, M., Rufchaei, R., Raeisi, M., Attar, M., Cordero, H., & Esteban, M. Á. (2015). Effects of date palm fruit extracts on skin mucosal immunity, immune related genes expression and growth performance of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Fish & Shellfish Immunology*, 47(2), 706–711. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.09.046>
- Huntingford, F., Rey, S., & Quaggiotto, M.-M. (2020). Behavioural fever, fish welfare and what farmers and fishers know. *Applied Animal Behaviour Science*, 231, 105090. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2020.105090>
- Llorente, I. (2013, November 26). *Eficiencia productiva y riesgo empresarial en la actividad acuícola*.
- Llorente, I., Fernández-Polanco, J., Baraibar-Diez, E., Odriozola, M. D., Bjørndal, T., Asche, F., Guillen, J., Avdelas, L., Nielsen, R., Cozzolino, M., Luna, M., Fernández-Sánchez, J. L., Luna, L., Aguilera, C., & Basurco, B. (2020). Assessment of the economic performance of the seabream and seabass aquaculture industry in the European Union. *Marine Policy*, 117, 103876. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2020.103876>
- Llorente, I., & Luna, L. (2016). Bioeconomic modelling in aquaculture: An overview of the literature. *Aquaculture International*, 24(4), 931–948. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9962-z>

- Mansour, A. T., Miao, L., Espinosa, C., García-Beltrán, J. M., Ceballos Francisco, D. C., & Esteban, M. Á. (2018). Effects of dietary inclusion of *Moringa oleifera* leaves on growth and some systemic and mucosal immune parameters of seabream. *Fish Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0515-z>
- Navarro, I., & Gutiérrez, J. (1995). Chapter 17 Fasting and starvation. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* (Vol. 4, pp. 393–434). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(06\)80020-2](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(06)80020-2)
- Oliva-Teles, A., & Gonçalves, P. (2001). Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 202(3–4), 269–278. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00777-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00777-3)
- Olsen, R. E., Suontama, J., Langmyhr, E., Mundheim, H., Ringo, E., Melle, W., Malde, M. K., & Hemre, G.-I. (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>
- Ortuño, J., Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (2002). Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85(1–2), 41–50. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00406-8](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00406-8)
- Pineiro-Vidal, M., Carballas, C. G., Gomez-Barreiro, O., Riaza, A., & Santos, Y. (2008). *Tenacibaculum soleae* sp. Nov., isolated from diseased sole (*Solea senegalensis* Kaup). *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 58(4), 881–885. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65539-0>
- Rakus, K., Ronsmans, M., Forlenza, M., Boutier, M., Piazzon, M. C., Jazowiecka-Rakus, J., Gatherer, D., Athanasiadis, A., Farnir, F., Davison, A. J., Boudinot, P., Michiels, T., Wiegertjes, G. F., & Vanderplasschen, A. (2017). Conserved Fever Pathways across Vertebrates: A Herpesvirus Expressed Decoy TNF- α Receptor Delays Behavioral Fever in Fish. *Cell Host & Microbe*, 21(2), 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.010>
- Rauw, W. (2012). *Feed efficiency and animal robustness* (pp. 105–122). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1436.1688>
- Rauw, W. M. (2012). Immune response from a resource allocation perspective. *Frontiers in Genetics*, 3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00267>
- Reyes-Becerril, M., Guluarte, C., Ceballos-Francisco, D., Angulo, C., & Esteban, M. Á. (2017). Dietary yeast *Sterigmatomyces halophilus* enhances mucosal immunity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 64, 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.027>
- Reyes-Becerril, M., Salinas, I., Cuesta, A., Meseguer, J., Tovar-Ramirez, D., Ascencio-Valle, F., & Esteban, M. Á. (2008). Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 25(6), 731–739. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.02.010>
- Rodríguez, A., Cuesta, A., Ortuño, J., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (2003). Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 96(3–4), 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2003.07.001>

- Storebakken, T. (1988). Krill as a potential feed source for salmonids. *Aquaculture*, 70(3), 193–205. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90096-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90096-8)
- Torrecillas, S., Montero, D., Carvalho, M., Benitez-Santana, T., & Izquierdo, M. (2021). Replacement of fish meal by Antarctic krill meal in diets for European sea bass *Dicentrarchus labrax*: Growth performance, feed utilization and liver lipid metabolism. *Aquaculture*, 545, 737166. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737166>
- Wei, Y., Chen, H., Jia, M., Zhou, H., Zhang, Y., Xu, W., Zhang, W., & Mai, K. (2019). Effects of dietary Antarctic krill *Euphausia superba* meal on growth performance and muscle quality of triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* farmed in sea water. *Aquaculture*, 509, 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.013>

Esta página ha sido intencionadamente dejada en blanco

Sección segunda

Capítulo V. Evaluación del crecimiento y de estado inmunitario de la liseta (*Chelon labrosus*) alimentada con dietas de bajo contenido energético y proteico



Chelon labrosus (Risso, 1827)

griego *cheilos* 'labio', el superior muy desarrollado (Barriuso, 1986)

Salina N^a S^a de los Desamparados (Puerto Real) 2004 (Foto: A. M. Arias)

Derechos cedidos por M. Arias, www.ictieterm.es

Sección segunda:

Evaluación de la valorización de subproductos de la industria cervecera en piensos para acuicultura

Capítulo V. Evaluación del crecimiento y de estado inmunitario de la liseta (*Chelon labrosus*) alimentada con dietas de bajo contenido energético y proteico

V.1 Resumen y objetivos

V.2 Materiales y métodos

V.2.1 Peces

V.2.2 Dietas

V.3.3 Diseño experimental

V.4.4 Análisis estadístico

V.3 Resultados

a) Comportamiento, canibalismo y mortalidad

b) Crecimiento

c) Parámetros inmunitarios

c.1. Parámetros de la inmunidad humoral

c.1.1) Actividad enzimática del suero

c.1.1.a) Actividad peroxidasa del suero

c.1.1.b) Actividad proteasa del suero

c.1.1.c) Actividad antiproteasa del suero

c.1.1.d) Actividad lisozima del suero

c.1.2) Actividad enzimática del moco de la piel

c.1.2.a) Actividad peroxidasa del moco de la piel

c.1.2.b) Actividad proteasa del moco de la piel

c.1.2.c) Actividad antiproteasa del moco de la piel

c.1.2.d) Actividad lisozima del moco de la piel

c.1.2.e) Cuantificación de proteínas

d) Parámetros de la inmunidad celular

d.1 Actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico

V.4 Discusión

V.5 Bibliografía

V.1 Resumen y objetivos

Este experimento es parte de los realizados durante la ejecución del Proyecto **MugilDiet**, Convocatoria Pleamar, FEMP (2017/2424). El objetivo principal del mencionado proyecto era el diseño de dietas adecuadas para mugílidos con una sustitución de la harina de pescado por subproductos del sector alimentario, así como su validación desde el punto de vista nutricional, inmunológico y respecto los parámetros óptimos de manejo y cultivo de estas especies.

El desarrollo del Proyecto **MugilDiet**, se realizó en las instalaciones de Animalario de la Universidad de Murcia, en las del Centro Integrado Público de Formación Profesional Marítimo Zaporito (CIPFP Marítimo Zaporito) (San Fernando, Cádiz), y en las instalaciones de los Servicios Centrales de Investigación de Cultivos Marinos de la Universidad de Cádiz (Puerto Real, Cádiz). En concreto este estudio se realizó en las instalaciones de la Universidad de Murcia.

El objetivo principal fue evaluar la capacidad de ejemplares de liseta (*C. labrosus*) para asimilar dietas de bajo contenido energético y proteico (formuladas con levaduras de desecho de la industria cervecera como principal fuente de proteína), así como su respuesta inmune al someterlos a regímenes alimentarios deficitarios e inferiores a los tradicionales (tanto en MN, mN, energía y cantidad —tasa diaria de alimento—) en comparación con los utilizados para otras especies cultivadas por ejemplo como el salmón, la dorada, la lubina, la corvina o la anguila.

Durante la realización de este trabajo se utilizaron diferentes dietas, tanto comerciales como fabricadas para el experimento, y con diferentes perfiles y niveles de nutrientes (*vide infra* apartado siguiente).

La evaluación se realizó de manera similar a los anteriores experimentos mediante el estudio de los parámetros clásicos de crecimiento y del estado del sistema inmunitario.

Como objetivos secundarios se estableció incrementar el conocimiento en los ingredientes utilizados —principalmente de las levaduras de desecho—, así como del resto de las materias primas incluidas en las dietas fabricadas en el Proyecto **MugilDiet**.

V.2 Materiales y métodos

De manera resumida se recogen los materiales y métodos particulares del experimento realizado.

V.2.1 Peces

Cuarenta y ocho ejemplares de liseta (*Chelon labrosus*) de peso inicial $44,23 \pm 2,68$ g (n=48) se obtuvieron del CIFP Marítimo Zaporito (San Fernando, Cádiz). Los peces fueron aleatoriamente distribuidos en nueve tanques iguales y aclimatados por un mes antes de comenzar el experimento, durante este periodo fueron alimentados con una dieta comercial para tilapia (Ti3, Skreeting, Burgos, España). Durante el experimento se evaluaron tres dietas, y los grupos se establecieron por triplicado, el número de peces por tratamiento fue de 16 (n=16).

V.2.2 Dietas

Durante el experimento se utilizaron tres dietas experimentales: Dieta A: Ti3 formulada para tilapia como dieta industrial (Skretting, Burgos, España); Dieta B: Biothesan 40 y Dieta C: Biothesan 70, como dietas específicamente formuladas para mugilidos (Biothesan, Granada, España). Para información adicional sobre dichas dietas *vide supra* el capítulo II, Materiales y métodos.

Las dietas se seleccionaron por diferentes motivos: Dieta A: bajo contenido en proteína (33,00 %) y grasas (6,5 %) y por ser de fabricación industrial; y las Dietas B y C por su bajo contenido en proteína (28,6 %) y grasa (9,5 % y 8,9 %) brutas. Las dietas B y C se formularon y fabricaron de manera que su contenido nutricional fuera isoproteico e isolipídico e isoenergético, con ligeras modificaciones en su composición (porcentaje de inclusión de harinas de pescado (25 % y 20 %) y de levaduras de desecho (55 % y 62,5 %).

La principal fuente de proteína de las dietas utilizadas es diferente, la Dieta A contenía un alto porcentaje de materias primas vegetales, trigo (32,6 %), harina de soja (30 %) y gluten de maíz (18%), y la harina de pescado (de calidad indeterminada) tan solo aportaba un 4,4 % del total de la dieta (% sobre peso húmedo). También contenía un porcentaje de harina de subproductos avícolas (11,4 %). Mientras que las dietas B y C

contenían un 20 y 25 % respectivamente de harina de pescado proveniente de desechos de conserveras y procesado de pesquerías, con un contenido en proteína bruta de un 56 % - 58 %. Porcentaje relativamente bajo frente a otros tipos de harina de pescado provenientes de la reducción de pesquerías que suelen oscilar entre el 65 % y el 72 %. La principal fuente de proteína de estas dietas son las levaduras de desecho, dieta B (55 %) y dieta C (62,5 %) —sobre peso húmedo—.

La cantidad de aceite de pescado también es variable en las dietas evaluadas, la dieta A no contiene ningún tipo de aceite de pescado (salvo el residual 10 % - 12 % de la harina de pescado) y como la inclusión de harina de pescado es de un 4,4 % como mucho el aporte de grasas de origen marino oscilará entre 4,4 y 5,8 g/kg de pienso. Como única fuente directa de lípidos incluye aceite vegetal (2,1 % de aceite de colza). El resto de las materias primas también pueden aportar un pequeño porcentaje de grasas, pero esa información no está disponible —y tampoco es relevante, dado el bajo contenido en grasas de la dieta A—. Las dietas B y C fueron formuladas con una inclusión de un 6,5 % de aceites de pescado, dicho aceite de pescado es de relativa baja calidad, y su origen es al igual que la harina de pescado de los desechos del procesado de la pesca por la industria conservera.

El perfil de ácidos grasos detallado de estas dietas y la composición detallada se recoge *vide supra* en el Capítulo II, Materiales y métodos. En la Tabla 10 resumimos los principales componentes de su análisis.

Tabla 10: Composición en ácidos grasos resumida

	B40	B70	Ti3
Total saturados	28,24	27,69	27,18
Total monoinsaturados	39,17	39,44	38,35
Total n-6 PUFA	10,45	10,55	25,26
20:5n-3 (EPA)	4,34	4,40	2,34
22:6n-3 (DHA)	13,72	13,92	2,01
Total n-3 PUFA	22,41	22,69	9,22
Total PUFA	32,86	33,24	34,47
n-3/n-6	2,14	2,15	0,37

En definitiva, aun siendo dietas tan diferentes en composición, podemos considerar que la variación en PB es mínima, al igual que la variación en GB, y la mayor diferencia está en el aporte de energía bruta por parte del ELN, y en el origen terrestre o marino de lípidos y grasas.

Las dietas B y C no contienen ningún tipo de materias primas vegetales terrestres, reiterando el motivo de evitar cualquier factor antinutricional (ANF). Ni de proteínas de animales terrestres procesados — habitualmente identificados por sus siglas en inglés como “*Land animal products*” (LAP) o “*Processed animal proteins*” (PAPs)— que suelen tener baja cantidad de proteína y una grasa residual (aproximadamente entre un 10 – 12 %) que no se consideró interesante incluir en la formulación de las dietas.

V.2.3 Diseño experimental

Los peces fueron estabulados durante 60 días (de los que solo fueron alimentados 52). La tasa de alimentación fue de un 1,5 % de la biomasa inicial total de cada tanque. Esta tasa de alimentación se puede considerar deficitaria incluso para peces omnívoros y de bajos requerimientos nutricionales como los mugílidos (Odum, 1968). No se realizaron muestreos de peso intermedio, ni corrección de la tasa de alimentación entre el muestro de peso inicial y final.

Después de ese periodo los peces se anestesiaron y se muestrearon aleatoriamente seis ejemplares por tanque, y tratamiento (n=16).

Se tomaron muestras de tejidos, sangre y moco, así como de riñón cefálico. Las muestras de suero y moco fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a - 80° C para su posterior tratamiento. Las muestras de riñón cefálico fueron procesadas y analizadas a la finalización del muestreo en el Servicio Universitario de Instrumentación Científica de la Universidad de Murcia para obtener los datos relativos a la inmunidad celular. El resto de muestras fueron analizadas en días posteriores para obtener los resultados de las actividades humorales siguiendo los métodos descritos con anterioridad en esta sección de la tesis. *Vide supra* Capítulo I, Materiales y métodos.

V.2.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos han sido representados en las gráficas y tablas correspondientes como la media \pm el error estándar (SEM) para cada parámetro medido. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS 19.0. Para calcular la normalidad de los datos previamente se realizó la prueba Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza fue verificada usando la prueba de Levene. Para comparar las medias entre muestras se realizó la prueba T de Student, y para los no normales, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (dichos datos se transformaron previamente). Las diferencias significativas entre grupos o dietas se analizaron mediante Anova factorial (cuando el número de grupos o dietas lo permitía), o alternativamente se realizó la prueba T de Student. Las pruebas Anova conllevaron un análisis post-hoc de Tukey o Games-Howell. Principalmente estas son las pruebas estadísticas realizadas para determinar las diferencias significativas entre ellas, considerando las diferencias estadísticamente significativas al 95% de nivel de confianza ($p \leq 0,05$) en todos los casos. Todas las medias se han realizado por triplicado.

V.3 Resultados

Del crecimiento de los peces y de los resultados de las diferentes técnicas analíticas realizadas sobre las muestras biológicas debidamente conservadas se recogen aquellas que se consideran más interesantes en función de los resultados obtenidos y los objetivos del experimento. Los métodos relativos a dichas técnicas reiteramos que se recogen en el capítulo I Materiales y métodos, *vide supra*.

a) Comportamiento, canibalismo y mortalidad

No se produjo ninguna mortalidad en los ejemplares sometidos a experimentación. Tampoco se produjeron episodios de canibalismo (inusuales en esta especie) aun siendo las tasas de alimentación deficitarias. Nunca se apreciaron visualmente heridas, erosiones de aletas, descamaciones, etc. producidas por episodios de agresividad.

Desde el punto de vista de esta investigación junto con el resto de experimentos realizados y resultados presentados en los capítulos anteriores, resulta interesante resaltar que aun siendo la alimentación suministrada teóricamente deficiente en cantidad y calidad de las dietas MN y mN no se han producido este tipo de episodios. Ni anteriormente en los ejemplares de dorada (*S. aurata*) con los que era previsible que ocurrieran este tipo de comportamientos, ni para los ejemplares de liseta (*C. labrosus*) en los que no se esperaba que sucediera.

En el caso de la dorada se puede considerar que las dietas consiguieron saciar a los animales, y aunque pudiera deberse a otros motivos, la lógica y aplicar el principio de parsimonia nos hace pensar que está es la explicación más probable. Con los ejemplares de lubina o de dorada aun alimentándolos *ad libitum* es normal que existan ejemplares que presenten heridas por agresiones, o que hayan sido comido por partes por sus congéneres —y sobre todo para las tallas utilizadas en esta investigación—. Episodios que suceden habitualmente en condiciones de estabulación en las mismas instalaciones Figura 35 A) y B). Donde se muestran una dorada y una lubina respectivamente depredadas por sus congéneres. Y los ataques suelen tener lugar primero en las partes blandas, ojos, abdomen o aletas, para finalizar comiéndose el músculo. Ya que en primer lugar estos ataques buscan imposibilitar a la presa que escape (cuando tienen igual tamaño y no pueden ser ingeridas enteras).

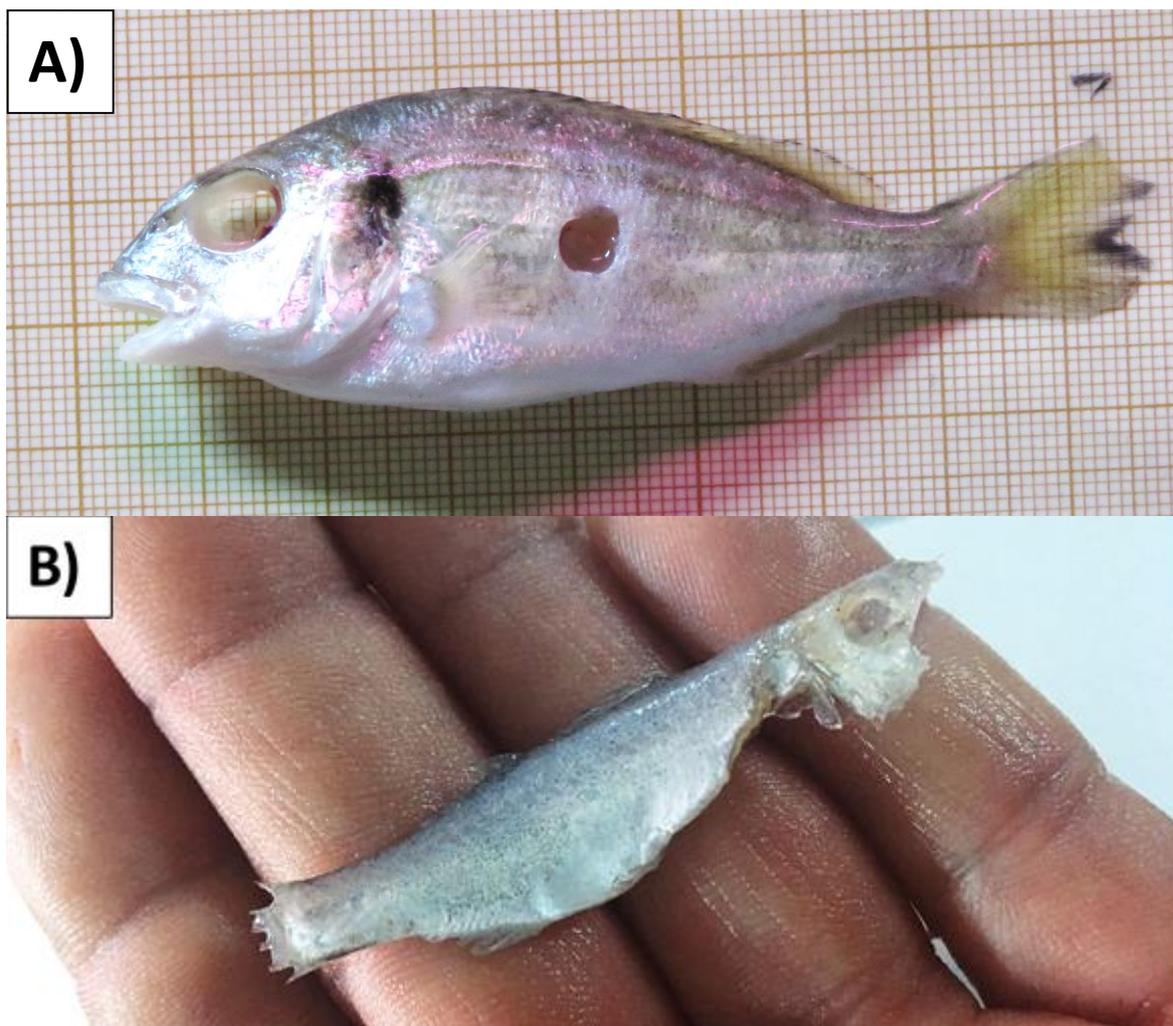


Figura 4. Ejemplares de A) dorada (*S. aurata*) y B) de lubina (*Dicentrarchus labrax*) depredados por sus congéneres de igual talla. Fotografía Luciano Vílchez-Gómez realizada en las instalaciones del Animalario de la Universidad de Murcia (2018).

En el caso de los mugílidos y en concreto del *C. labrosus* no se puede considerar que las dietas consiguieron saciar a los animales, por la ausencia de estos comportamientos, ya que independientemente de si están siendo alimentados o no, la especie no presenta pautas de agresividad entre congéneres, ni canibalismo. Al menos, no ha sucedido en nuestra utilización de la especie durante los experimentos, ni durante la estabulación.

b) Crecimiento

A partir de los datos obtenidos durante los muestreos biométricos los días 0, y 60 de peso (P), ($g \pm 0,01$) y la ración diaria proporcionada a cada grupo experimental se pudieron calcular los parámetros relativos al crecimiento de los sujetos experimentales y el aprovechamiento de la alimentación proporcionada (Tabla 2). No existiendo diferencias entre los diferentes tratamientos y grupos experimentales.

Tabla 11: Índices de crecimiento y aprovechamiento del alimento durante el periodo experimental

Dieta (denom. Comercial)	ICA	ICAC	% crecimiento*	IP**	TEP	FE	TCE
Dieta A (Ti3)	1,75 ± 0,25	1,75	63,15	197,71	1,78 ± 0,22	0,58 ± 0,07	0,79 ± 0,20
Dieta B (B40)	1,59 ± 0,34	0,99	58,63	201,79	2,08 ± 0,27	0,62 ± 0,07	0,81 ± 0,19
Dieta C (B70)	1,72 ± 0,42	1,07	85,47	190,12	2,45 ± 0,74	0,70 ± 0,21	0,92 ± 0,39

Crecimiento e índices de crecimiento de los tratamientos Dieta A, B, C y D.. Valores promedio ± error estándar de la media.

No hay diferencias significativas entre los parámetros analizados ($P < 0,05$)

* % de crecimiento desde la talla inicial, no evaluado estadísticamente ** Ingesta de proteína

ICA= Índice de conversión del alimento, TEP= Tasa de eficiencia de la proteína

ICAC: Índice de conversión del alimento corregido en humedad

ICAC: $[ICA \cdot (100 - \% \text{ humedad dieta})] / (100 - 8)$ Considerando una humedad inicial en la dietas A de un 8% y en B y C de 43 %

TCE= Tasa de crecimiento específico [En inglés SGR o *specific growth rate*]

Es interesante comprobar en los datos la mejor utilización por parte de los peces de las dietas húmedas B y C siendo mejores los datos de conversión del alimento ICA y ICAC, y muy similares el resto de datos tanto de eficiencia de la proteína como de eficiencia en general del alimento. De igual modo sucede con la tasa de crecimiento específico (TCE), que es similar, aun teniendo la dieta A mucha más energía bruta que las dietas B y C. Aunque el crecimiento en % desde el inicio del experimento arroja una diferencia considerable para los peces alimentados con la dieta C que contiene más levaduras.

c) Parámetros inmunitarios

En los siguientes apartados se muestran los resultados de las actividades evaluadas de la inmunidad humoral y celular que fueron analizadas en los ejemplares sujetos a experimentación. Casi todas ellas muestran significaciones estadísticas ($P < 0,05$), tanto entre grupos, dietas o entre los grupos de peces que fueron infectados con *T. soleae* al final del periodo de experimentación.

En el caso concreto de este experimento el análisis estadístico se realizó entre las diferentes dietas (o grupos). Siendo mínimas las diferencias entre estas dietas que arrojan resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$).

c.1 Parámetros de la inmunidad humoral

En los siguientes apartados se muestran las actividades de la inmunidad humoral que fueron analizadas en los ejemplares sujetos a experimentación.

c.1) Actividad enzimática del suero

c.1.1.a) Actividad peroxidasa del suero

En la Figura 36 se muestran los niveles de peroxidasa del suero después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (A, B y C). No existen ni muestran resultados estadísticamente significativos entre las dietas ($P < 0,05$).

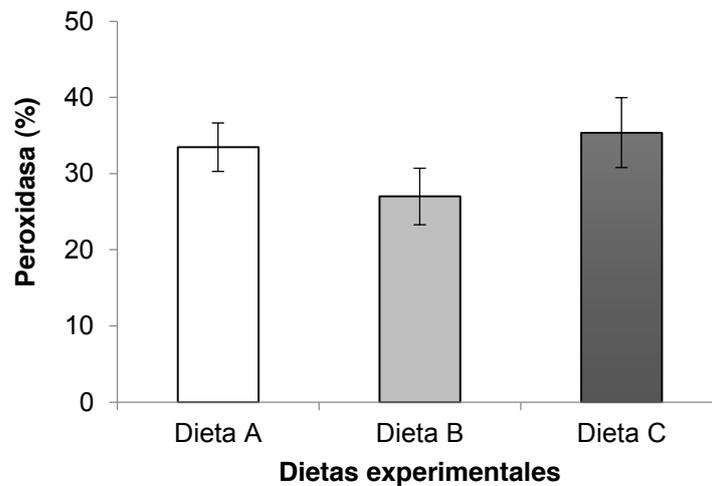


Figura 36. Niveles totales de peroxidasa en suero después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (Dieta A; B; C). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta x grupo); * denota diferencias significativas entre las dietas (A, B, C). ($P < 0,05$).

c.1.1.b) Actividad proteasa del suero

En la Figura 37 se muestran los niveles de proteasa del suero después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (A, B y C). No existen ni muestran resultados estadísticamente significativos entre las dietas ($P < 0,05$).

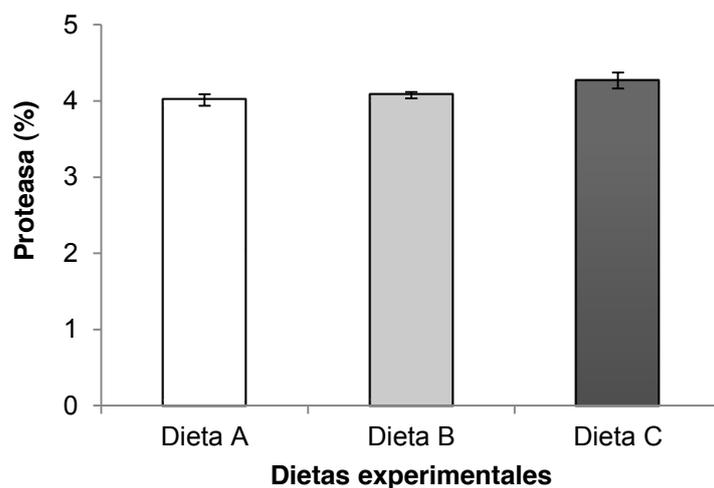


Figura 37. Niveles totales de proteasa del suero después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (Dieta A; B; C). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta x grupo); * denota diferencias significativas entre las dietas (A, B, C). ($P < 0,05$).

c.1.1.c) Antiproteasa del suero

En la Figura 38 se muestran los niveles de antiproteasa del suero después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (A, B y C). No existen ni muestran resultados estadísticamente significativos entre las dietas ($P < 0,05$).

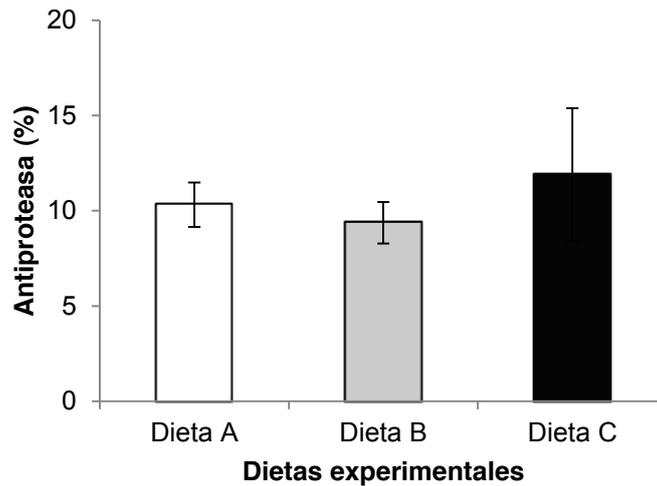


Figura 38. Niveles totales de antiproteasa del suero después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (Dieta A; B; C). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta x grupo); * denota diferencias significativas entre las dietas (A, B, C). ($P < 0,05$).

c.1.1.d) Actividad lisozima del suero

En la Figura 39 se muestran los niveles de lisozima del suero ($\mu\text{g/mL}$ equivalente de actividad HEWL) después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (A, B y C). No existen ni muestran resultados estadísticamente significativos entre las dietas ($P < 0,05$).

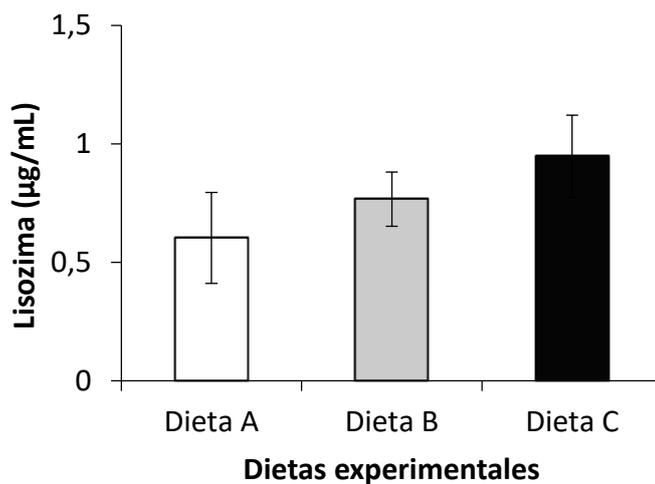


Figura 39. Niveles totales de lisozima del suero después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (Dieta A; B; C). ($\mu\text{g/mL}$ equivalente de actividad HEWL). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ($n=10$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta x grupo); * denota diferencias significativas entre las dietas (A, B, C). ($P < 0,05$).

c.1.2) Actividad enzimática del moco de la piel

De las actividades enzimáticas analizadas del moco de la piel de los peces, se analizaron todas las actividades propuestas en el diseño experimental. De manera similar a como se ha hecho en el resto de experimentos se muestran de manera ordenada. Siendo mínimas las diferencias encontradas entre los diferentes tratamientos (Dietas A, B y C) estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

c.1.2.a) Actividad peroxidasa del moco de la piel

En la Figura 40 se muestran los niveles de peroxidasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (A, B y C). No existen ni muestran resultados estadísticamente significativos entre las dietas ($P < 0,05$).

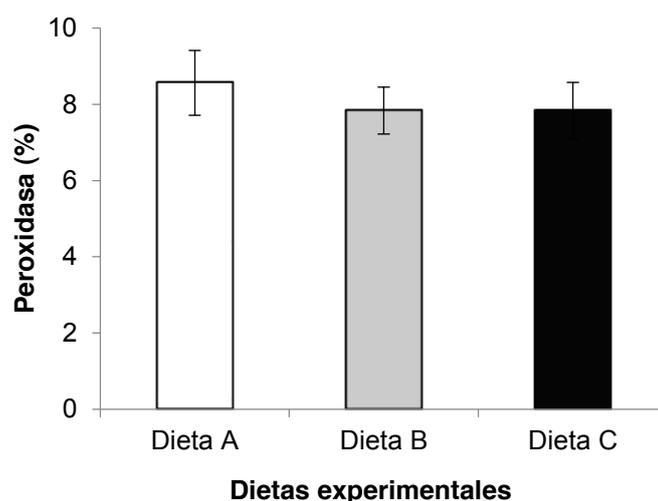


Figura 40. Niveles totales de peroxidasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (Dieta A; B; C). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ($n=10$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta x grupo); * denota diferencias significativas entre las dietas (A, B, C). ($P < 0,05$).

c.1.2.b) Actividad proteasa del moco de la piel

En la Figura 41 se muestran los niveles de peroxidasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (A, B y C). No existen ni muestran resultados estadísticamente significativos entre las dietas ($P < 0,05$).

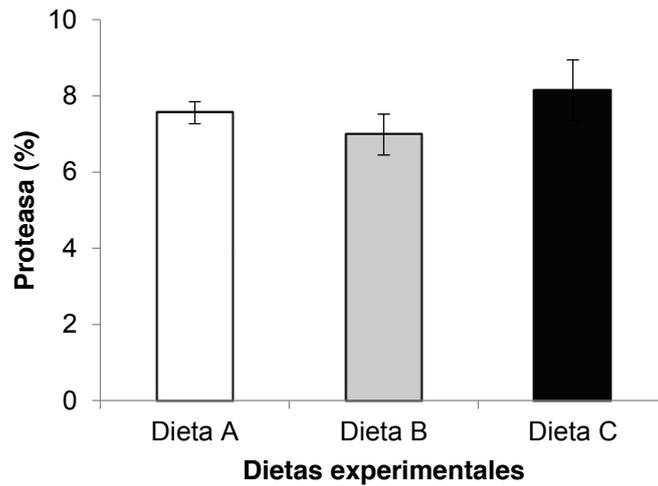


Figura 41. Niveles totales de proteasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (Dieta A; B; C). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ($n=10$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta x grupo); * denota diferencias significativas entre las dietas (A, B, C). ($P < 0,05$).

c.1.2.c) Actividad antiproteasa del moco de la piel

En la Figura 42 se muestran los niveles de antiproteasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (A, B y C). No existen ni muestran resultados estadísticamente significativos entre las dietas ($P < 0,05$).

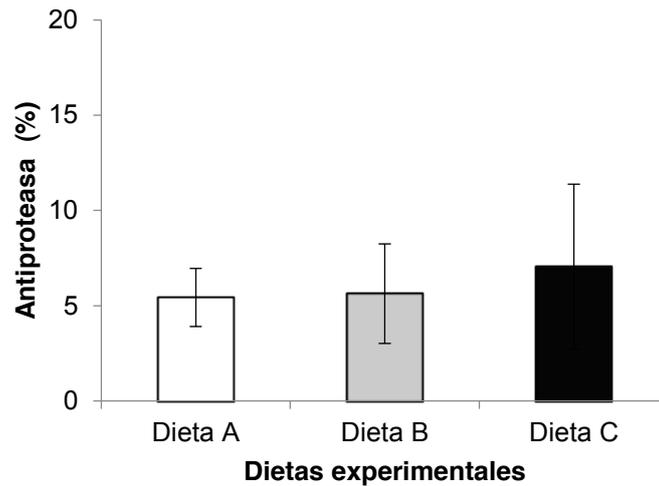


Figura 42. Niveles totales de antiproteasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (Dieta A; B; C). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta x grupo); * denota diferencias significativas entre las dietas (A, B, C). ($P < 0,05$).

c.1.2.d) Actividad lisozima del moco de la piel

En la Figura 43 se muestran los niveles de lisozima del moco de la piel ($\mu\text{g/mL}$ equivalente de actividad HEWL) después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (A, B y C). No existen ni muestran resultados estadísticamente significativos entre las dietas ($P < 0,05$).

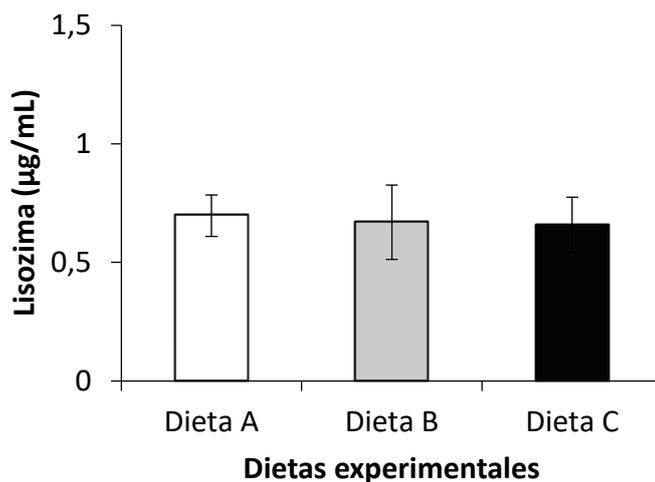


Figura 43. Niveles totales de lisozima del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (Dieta A; B; C). ($\mu\text{g/ml}$ equivalente de actividad HEWL). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ($n=10$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta x grupo); * denota diferencias significativas entre las dietas (A, B, C). ($P < 0,05$).

Los niveles de lisozima del moco de la piel ($\mu\text{g/mL}$ equivalente de actividad HEWL) y del suero de los *C. labrosus* son similares en cantidad, aunque algo más elevados en suero para las dietas B y C (entre 0,5 y 1 $\mu\text{g/mL}$ equivalente de actividad HEWL) y no presentan en ningún caso diferencias significativas. Los valores presentados en el Capítulo 4 para dorada (*S. aurata*) son muy superiores (entre 5,5 y 6,9 $\mu\text{g/mL}$ equivalente de actividad HEWL)

c.1.2.e) Cuantificación de proteínas en el moco de la piel

En la Figura 44 se muestran los niveles de proteína del moco de la piel (mg/mL) después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (A, B y C). No existen ni muestran resultados estadísticamente significativos entre las dietas ($P < 0,05$).

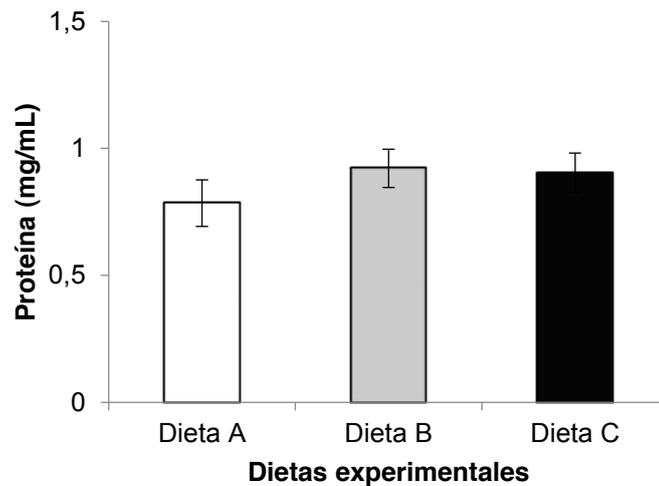


Figura 44. Niveles totales de proteína en el moco de la piel después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (Dieta A; B; C). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ($n=10$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta x grupo); * denota diferencias significativas entre las dietas (A, B, C). ($P < 0,05$).

Los valores presentados en el Capítulo 4 para dorada (*S. aurata*) son algo superiores (entre 1,2 y 1,4 mg/mL).

En experimentos anteriores para *C. labrosus* (Vilchez-Gomez, 2017). Los valores presentados se encontraban en un rango aproximadamente entre 1,4 y 1,8 mg/mL.

d) Parámetros de la inmunidad celular

En los siguientes apartados se muestran las actividades de la inmunidad celular que fueron analizadas en los ejemplares sujetos a experimentación. En general, en la evaluación de la inmunidad celular se repite el patrón que ya hemos puesto de manifiesto durante los apartados anteriores sobre la inmunidad humoral. Y no se muestran diferencias significativas estadísticamente salvo para la habilidad fagocítica, y solo entre las dietas A y B (letra a) frente a la C (letra b) que tiene un porcentaje más elevado de habilidad. Esto aun siendo las dietas A, B y C, tan diferentes en composición (desde el grado de humedad, hasta el origen de las materias primas, vegetales y animales para la dieta A, y basadas en levaduras de desecho en más de un 60 % para las dietas A y B).

Lamentablemente los datos de la actividad peroxidasa de los leucocitos de riñón cefálico y de la explosión respiratoria de los leucocitos de riñón cefálico por un problema con el almacenamiento de datos fortuito y ajeno a la voluntad de los investigadores no están disponibles.

d.1 Actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico

La habilidad fagocítica se define como el porcentaje de células de levaduras marcadas (con FITC) con una o más bacterias ingeridas dentro de la población celular fagocítica, mientras que la capacidad fagocítica se define como la intensidad media de fluorescencia. En la Figura 45 se muestran los valores de la capacidad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico, así como en la Figura 46, los valores de la habilidad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico.

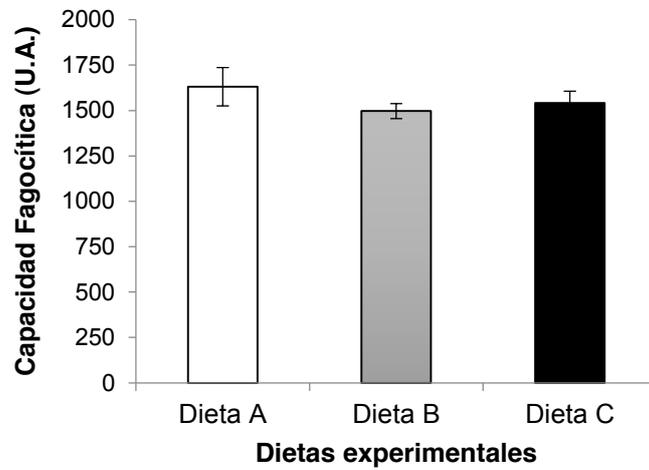


Figura 45. Valores de capacidad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico de *Chelon labrosus* después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (Dieta A; B; C). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta x grupo); * denota diferencias significativas entre las dietas (A, B, C). (P <0,05).

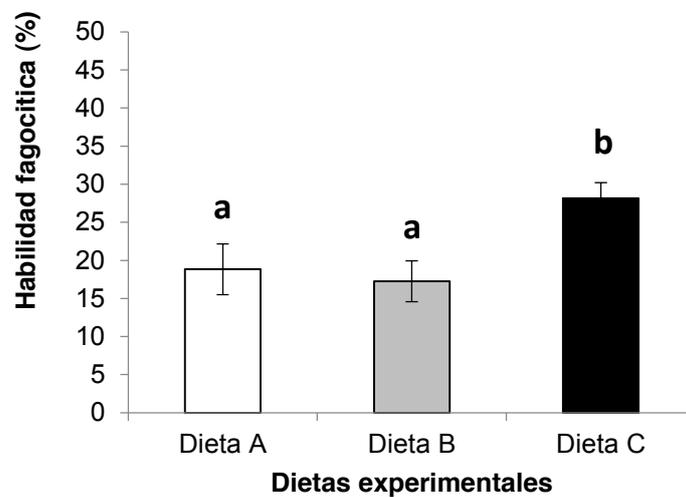


Figura 46. Valores de habilidad fagocítica en leucocitos de riñón cefálico de *Chelon labrosus* después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (Dieta A; B; C). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta x grupo); * denota diferencias significativas entre las dietas (A, B, C). (P <0,05).

V.4 Discusión

Prácticamente no existen diferencias entre los diferentes tratamientos y grupos experimentales, salvo una diferencia positiva a favor de la dieta C en la capacidad fagocítica. En general estos resultados confirman los obtenidos en el experimento anterior en el que se alimentaron con estas mismas dietas a ejemplares de dorada (*S. aurata*). En este caso y debido a la falta de ejemplares para probar la dieta de alta energía y proteína (Mar Perla L) se prescindió de ella. Hay que expresar que las tasas de conversión de alimento son mejores en los mugílidos (con las mismas dietas) que, para la dorada del anterior experimento, pero aun así son bastante similares. La tasa de eficiencia proteica y la tasa de crecimiento específico también son menores en dorada, pero también estas eran menores de tamaño al inicio del experimento ($12,86 \pm 0,28$ g), frente a los $44,23 \pm 2,68$ g de esta experimentación, por lo que el crecimiento (aún a bajas tasas de alimentación, proteína y energía) se espera que sea mayor (Holt, 2011).

Respecto a la capacidad de ejemplares de liseta (*C. labrosus*) para asimilar dietas de bajo contenido energético y proteico (formuladas con levaduras de desecho de la industria cervecera como principal fuente de proteína), así como su respuesta inmune al someterlos a regímenes alimentarios deficitarios e inferiores a los tradicionales (tanto en MN, mN, energía y cantidad —tasa diaria de alimento—) podemos decir que se demuestra la capacidad de la especie para crecer aún con un régimen de alimentación deficitario (en tasa de alimentación) y unas dietas óptimas para la especie. Y de mantener un estado inmunitario óptimo para hacer frente a la enfermedad. Poniendo de manifiesto la capacidad descrita anteriormente y no en pocos estudios de los mugílidos para crecer con dietas bajas en energía (Arias & Drake, 1990; Cardona, 2016; Cardona Pascual, 1990, 1995; Gisbert et al., 1995; Odum, 1968, 1970).

Al contrario que sucede con la dorada (*S. aurata*), u otras especies carnívoras que si presentan comportamientos agresivos y canibalismo cuando no están saciados, esta ausencia de agresividad entre los ejemplares de *C. labrosus* mantenidos en condiciones experimentales no puede considerarse una consecuencia de que los animales estuvieran saciados con la dieta. Ya que no es habitual que existan episodios de canibalismo en las especies de mugílidos salvo en tallas muy pequeñas como sucede con todos los peces, pero después este hábito desaparece (Comunicación personal J. A. Calderón, Maestro en acuicultura y experto en mugílidos). Aunque este aspecto se abordará detenidamente en la discusión general.

V.5 Bibliografía

- Arechavala-Lopez, P., Uglem, I., Sanchez-Jerez, P., Fernandez-Jover, D., Bayle-Sempere, J., & Nilsen, R. (2010). Movements of grey mullet *Liza aurata* and *Chelon labrosus* associated with coastal fish farms in the western Mediterranean Sea. *Aquaculture Environment Interactions*, 1(2), 127–136. <https://doi.org/10.3354/aei00012>
- Arias, A. M., & Drake, P. (1990). *Estados juveniles de la ictiofauna en los caños de las salinas de la bahía de Cádiz*. CSIC - Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN). <https://digital.csic.es/handle/10261/46962>
- Bateman, A. W., Peacock, S. J., Connors, B., Polk, Z., Berg, D., Krkošek, M., & Morton, A. (2016). Recent failure to control sea louse outbreaks on salmon in the Broughton Archipelago, British Columbia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 73(8), 1164–1172. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2016-0122>
- Bateman, A. W., Teffer, A. K., Bass, A., Ming, T., Kaukinen, K., Hunt, B. P. V., Krkošek, M., & Miller, K. M. (2022). Atlantic salmon farms are a likely source of *Tenacibaculum maritimum* infection in migratory Fraser River sockeye salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 79(8), 1225–1240. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2021-0164>
- Bayle-Sempere, J. T., Arreguín-Sánchez, F., Sanchez-Jerez, P., Salcido-Guevara, L. A., Fernandez-Jover, D., & Zetina-Rejón, M. J. (2013). Trophic structure and energy fluxes around a Mediterranean fish farm. *Ecological Modelling*, 248, 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2012.08.028>
- Cámara Ruiz, M., Espírito Santo, C., Mai, A., Gessner, J., & Wuertz, S. (2019). Can juvenile Baltic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) smell the enemy? *Journal of Applied Ichthyology*, 35(4), 835–842. <https://doi.org/10.1111/jai.13934>
- Cardona, L. (2016). Food and Feeding of Mugilidae. In D. Crosetti, *Biology, Ecology and Culture of Grey Mulletts (Mugilidae)*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19927-17>
- Cardona Pascual, L. (1990). *Composición química del alimento natural de diferentes mugílidos (Osteichthyes, Mugilidae) del Mediterráneo Norte*. <http://portalrecerca.csuc.cat/36124972>
- Cardona Pascual, L. (1995). *Efectividad del pienso para dorada y del pienso para carpa en el preengorde de Mugil cephalus*. <http://portalrecerca.csuc.cat/36124976>
- Dempster, T., Uglem, I., Sanchez-Jerez, P., Fernandez-Jover, D., Bayle-Sempere, J., Nilsen, R., & Bjørn, P. (2009). Coastal salmon farms attract large and persistent aggregations of wild fish: An ecosystem effect. *Marine Ecology Progress Series*, 385, 1–14. <https://doi.org/10.3354/meps08050>
- Edwards, P. (2015). Aquaculture environment interactions: Past, present and likely future trends. *Aquaculture*, 447, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.001>

- Fernandez-Jover, D., Sanchez-Jerez, P., Bayle-Sempere, J. T., Valle, C., & Dempster, T. (2008). Seasonal patterns and diets of wild fish assemblages associated with Mediterranean coastal fish farms. *ICES Journal of Marine Science*, *65*(7), 1153–1160. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsn091>
- Gisbert, E., Cardona, L., & Orvay, F. (1995). Alimentación de los alevines de mugílidos en el delta del Ebro. *Miscel·lània Zoològica; Vol.: 18*.
- Glatz, P., & Bourke, M. (2006). *Beak Trimming Handbook for Egg Producers: Best Practice for Minimising Cannibalism in Poultry*. Landlinks Press.
- González Silvera, D. (2016). Effects of excedent commercial feed consumption on fatty acid profile from marine fauna aggregated to fish farms = Efectos del consumo de pienso comercial excedente en el perfil de ácidos grasos de la fauna marina agregada a piscifactorías. *Proyecto de investigación*: <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/48097>
- Gonzalez-Silvera, D., Guardiola, F. A., Cordero, H., Cuesta, A., Esteban, M. A., Martínez-López, F. J., & López-Jiménez, J. A. (2017). The short-term effects of farmed fish food consumed by wild fish congregating outside the farms. *Marine Pollution Bulletin*, *114*(2), 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.055>
- Gonzalez-Silvera, D., Martinez-Rubio, L., Abad Mateo, M. E., Rabadan-Ros, R., López Jiménez, J. A., & Martínez López, F. J. (2016). Assessing feeding history and health status through analysis of fatty acids and fat content in golden mullet *Liza aurata*. *ICES Journal of Marine Science: Journal Du Conseil*, *73*(10), 2632–2643. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsw092>
- Hamano, K., Miyoshi, T., Aue-umneoy, D., Srisapoome, P., Maeno, Y., & Tsutsui, I. (2015). Waterborne and cannibalism-mediated transmission of the Yellow head virus in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, *437*, 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.038>
- Holt, J. (Ed.). (2011). *Larval fish nutrition*. Wiley-Blackwell.
- Izquierdo-Gómez, D., González-Silvera, D., Arechavala-López, P., López-Jiménez, J. Á., Bayle-Sempere, J. T., & Sánchez-Jerez, P. (2015). Exportation of excess feed from Mediterranean fish farms to local fisheries through different targeted fish species. *ICES Journal of Marine Science*, *72*(3), 930–938. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsu179>
- Johnstone, C., Pérez, M., Arizcun, M., García-Ruiz, C., & Chaves-Pozo, E. (2022). Reservoirs of Red-Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) in Squid and Shrimp Species of Northern Alboran Sea. *Viruses*, *14*, 328. <https://doi.org/10.3390/v14020328>
- Król, J., Długoński, A., Błażejowski, M., & Hliwa, P. (2019). Effect of size sorting on growth, cannibalism, and survival in Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. post-larvae. *Aquaculture International*, *27*(4), 945–955. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-00337-3>

- Liu, X., Xia, J., Pang, H., & Yue, G. (2017). Who eats whom, when and why? Juvenile cannibalism in fish Asian seabass. *Aquaculture and Fisheries*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2016.12.001>
- Odum, W. E. (1968). Mullet grazing on a dinoflagellate bloom. *Chesapeake Science*, 9(3), 202–204. <https://doi.org/10.2307/1351186>
- Odum, W. E. (1970). Utilization of the direct grazing and plant detritus food chain by the striped mullet *Mugil cephalus*. In J. H. Steele, Aarhus universitet, & International Council for the Exploration of the Sea (Eds.), *Marine food chains* (pp. 220–239). Oliver & Boyd.
- Peacock, S. J., Krkošek, M., Bateman, A. W., & Lewis, M. A. (2020). Estimation of spatiotemporal transmission dynamics and analysis of management scenarios for sea lice of farmed and wild salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 77(1), 55–68. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2019-0036>
- Savory, C. J. (1995). Feather pecking and cannibalism*. *World's Poultry Science Journal*, 51(2), 215–219. <https://doi.org/10.1079/WPS19950016>
- Valdés, V. P., Fernandez, C., Molina, V., Escribano, R., & Joux, F. (2017). Dissolved Compounds Excreted by Copepods Reshape the Active Marine Bacterioplankton Community Composition. *Frontiers in Marine Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00343>
- Vilchez-Gomez, L. (2017). *Evaluación de dietas en mugílicos. Trabajo fin de Máster*. [Master Thesis Máster Universitario en Gestión de Recursos Pesqueros y Acuicultura. Facultad de Biología.]. Universidad de Murcia.

Sección segunda

Capítulo VI Evaluación del crecimiento y de estado inmunitario de la liseta (*Chelon labrosus*) alimentada con dietas industriales



Mugil cephalus (Linnaeus, 1758)

latín *mugil*, nombre del pez; griego *kephalé* 'cabeza', gran tamaño (Barriuso, 1986)

(Foto: A. M. Arias)

Derechos cedidos por M. Arias, www.ictieterm.es

Sección segunda:

Evaluación biológica de la valorización de subproductos de la industria cervecera en piensos para acuicultura

Capítulo VI. Crecimiento de la liseta (*Chelon labrosus*) alimentada con dietas industriales

VI.1 Resumen y objetivos

VI.2 Materiales y métodos

VI.2.1 Peces

VI.2.2 Dietas

VI.2.3 Diseño experimental

VI.2.4 Análisis estadístico

V.3 Resultados

a) Comportamiento, canibalismo y mortalidad

b) Crecimiento

c) Parámetros de la inmunidad

c.1. Parámetros de la inmunidad humoral

c.1.1) Actividad enzimática del suero

c.1.1.a) Actividad peroxidasa del suero

c.1.1.b) Actividad proteasa del suero

c.1.1.c) Actividad antiproteasa del suero

c.1.1.d) Actividad lisozima del suero

c.1.2) Actividad enzimática del moco de la piel

c.1.2.a) Actividad peroxidasa del moco de la piel

c.1.2.b) Actividad proteasa del moco de la piel

c.1.2.c) Actividad antiproteasa del moco de la piel

c.1.2.d) Actividad lisozima del moco de la piel

c.1.2.e) Cuantificación de proteínas

d) Parámetros de la inmunidad celular

d.1 Actividad peroxidasa de los leucocitos de riñón cefálico

d.2 Explosión respiratoria de los leucocitos de riñón cefálico

d.3 Actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico

VI.4 Discusión

VI.5 Bibliografía

VI.1 Resumen y objetivos

Este experimento es parte de los ensayos realizados durante la ejecución del Proyecto **MugilDiet**, Convocatoria Pleamar, FEMP (2017/2424). Del mismo modo que el experimento anterior, capítulo V. El objetivo principal del mencionado proyecto era el diseño de dietas adecuadas para mugílidos con una sustitución de la harina de pescado por subproductos del sector alimentario, así como su validación desde el punto de vista nutricional, inmunológico y respecto los parámetros óptimos de manejo y cultivo de estas especies.

Este estudio se realizó en las instalaciones del Animalario de la Universidad de Murcia. El objetivo principal fue evaluar la capacidad de ejemplares de liseta (*C. labrosus*) para asimilar dietas industriales con diferentes porcentajes de energía, proteína y grasas, así como su respuesta inmunitaria frente a un patógeno oportunista como *T. soleae*. En este trabajo se utilizaron dos dietas diferentes industriales con unos perfiles muy diferentes de MN, mN, energía, o de materias primas. Esta evaluación de manera similar a los anteriores experimentos se realizó mediante el estudio de los parámetros clásicos de crecimiento y del estado del sistema inmunitario, y se desarrolló durante 78 días.

Como objetivo secundario se estableció incrementar el conocimiento sobre los ejemplares de liseta de un tamaño relativamente grande, de peso inicial $160,25 \pm 9,30$ g (n=20), frente a la exposición al patógeno *T. soleae*. Y la respuesta inmunitaria al estar alimentados con dos dietas de perfiles absolutamente diferentes. Una que podía entenderse óptima para la especie (Ti3), y otra con unos contenidos de nutrientes y niveles de energía excesivos diseñada y formulada para especies carnívoras (D4), ambas de Skretting proveedor de alimento de la máxima garantía a nivel mundial. Siendo la dieta D4 de alto contenido energético y calidad (harina de soja tostada, gluten de maíz, harina de pescado, aceite de pescado y poco ELN), frente a otra dieta de también un alto contenido energético pero aportado por el ELN, y de relativa peor calidad (no incluye aceite de pescado y de harina de pescado solo un 4,4 % respecto de y el resto de materias primas son o vegetales, o subproductos de animales terrestres (LAP). *Vide supra* el Capítulo II, Materiales y métodos.

VI.2 Materiales y métodos

De manera resumida se recogen los materiales y métodos particulares del experimento realizado.

VI.2.1 Peces

Cuarenta ejemplares de liseta (*Chelon labrosus*) de peso inicial $160,25 \pm 9,30$ g se obtuvieron del CPIFP Marítimo Zaporito (San Fernando, Cádiz). Los peces fueron aleatoriamente distribuidos en nueve tanques iguales y aclimatados por cuatro semanas antes de comenzar el experimento, durante este periodo fueron alimentados con una dieta comercial para tilapia (Ti3, Skreeting, Burgos, España). Durante el experimento se evaluaron dos dietas, por duplicado, en un sistema de recirculación y el número de peces por tratamiento fue de 20 (n=20).

VI.2.2 Dietas

Durante el experimento se utilizaron dos dietas experimentales: Dieta A: Ti3 para Tilapia (Skreeting, Burgos, España); y Dieta B: D4 Optibream AE 2P (Skreeting, Burgos, España). Para información adicional sobre dichas dietas *vide supra* el Capítulo de Materiales y métodos.

Las dietas se seleccionaron por diferentes motivos: Dieta A: bajo contenido en proteína (33,00 %) y grasas (6,5 %) y de fabricación industrial; y la Dietas B por su alto contenido en proteína y grasa (46,00 % y 19,00 %) y de fabricación también industrial. Respecto del ELN la dieta A aproximadamente dobla la cantidad de la dieta B, 45,5 % y 20,4 % respectivamente (calculados por diferencia $ELN = 1000 - PB - GB - CB - H$).

La principal fuente de proteína de las dietas varía siendo la Dieta A alta en Trigo (32,6 %) y harina de soja (30 %) y tan solo un 4,4 % de harina de pescado (de calidad indeterminada), también contiene un porcentaje bajo de harina de subproductos avícolas LAP (11,4 %) y La dieta B contenía un 15 % de harina de pescado (de calidad indeterminada), harina de extracción de soja tostada (27,9 %), gluten de maíz (25 %), siendo sus principales fuentes de proteína la harina de pescado, la soja y la harina de maíz.

La cantidad de aceite de pescado también es variable en las dietas evaluadas, la dieta A no contiene (de un total de un 6,5 % de grasas y aceites) salvo el residual de la harina de pescado, y como única fuente adicional de lípidos a los que aportan el resto de las materias primas incluye un 2,1 % de aceite de colza. La dieta B en su formulación contiene un 6,6 % de aceite de pescado y un 6,3 % de aceite de colza.

VI.2.3 Diseño experimental

Los peces fueron estabulados durante 78 días, de los que solo fueron alimentados 66. La tasa de alimentación fue de un 1,5 % de la biomasa inicial total de cada tanque. Esta tasa es inferior al 3,7 – 4,6 % recomendado por el fabricante para tilapias entre 100 y 200 g alimentadas con el pienso Ti3. No se realizaron muestreos de peso intermedio, ni corrección de la tasa de alimentación entre el muestro de peso inicial y final (n=20).

Después de ese periodo los peces se anestesiaron y se muestrearon aleatoriamente cinco ejemplares por tanque y tratamiento (n=20). Otros cinco ejemplares aleatoriamente por tratamiento y tanque fueron retados mediante inyección intraperitoneal con *Tenacibaculum soleae* (10^7 ufc/ml) (n=20). Estos peces retados después de 24 horas expuestos al patógeno fueron anestesiados y muestreados. El procedimiento se realizó de la misma manera que se describe en el capítulo IV, *vide supra*.

Se tomaron muestras de tejidos o sangre. entre ellas suero, moco, piel o intestino. Las cuales fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C para su posterior tratamiento. Las muestras de riñón cefálico fueron analizadas a la finalización del muestreo en el Servicio Universitario de Instrumentación Científica de la Universidad de Murcia. El resto de muestras congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C para su posterior tratamiento fueron analizadas posteriormente para obtener los resultados de las actividades celulares y humorales siguiendo los métodos descritos con anterioridad en esta sección de la tesis. *Vide supra* Capítulo I, Materiales y métodos.

VI.2.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos han sido representados en las gráficas y tablas correspondientes como la media \pm el error estándar (SEM) para cada parámetro medido. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS 19.0. Para calcular la normalidad de los datos previamente se realizó la prueba Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza fue verificada usando la prueba de Levene. Para comparar las medias entre muestras se realizó la prueba T de Student, y para los no normales, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (dichos datos se transformaron previamente). Las diferencias significativas entre grupos o dietas se analizaron mediante Anova factorial (cuando el número de grupos o dietas lo permitía), o alternativamente se realizó la prueba T de Student. Las pruebas Anova conllevaron un análisis post-hoc de Tukey o Games-Howell. Principalmente estas son las pruebas estadísticas realizadas para determinar las diferencias significativas entre ellas, considerando las diferencias estadísticamente significativas al 95% de nivel de confianza ($p \leq 0,05$) en todos los casos. Todas las medias se han realizado por triplicado.

VI.3 Resultados

Del crecimiento de los peces y de los resultados de las diferentes técnicas analíticas realizadas sobre las muestras biológicas debidamente conservadas se recogen aquellas que se consideran más interesantes en función de los resultados obtenidos y los objetivos del experimento. Los métodos relativos a dichas técnicas se recogen en el capítulo I, Materiales y métodos, *vide supra*.

a) Comportamiento, canibalismo y mortalidad

No se produjo ninguna mortalidad en los ejemplares sometidos a experimentación, ni ningún tipo de agresión, canibalismo, etc. como es habitual que suceda con esta especie.

b) Crecimiento

A partir de los datos obtenidos durante los muestreos biométricos los días 0, y 78 de peso (P), ($g \pm 0,01$) y la ración diaria proporcionada a cada grupo experimental se pudieron calcular los parámetros relativos al crecimiento de los sujetos experimentales y el aprovechamiento de la alimentación proporcionada (Tabla 12).

Tabla 12: Índices de crecimiento y aprovechamiento del alimento durante el periodo experimental

Dieta (denom. Comercial)	ICA	ICAC	% crecimiento*	IP**	TEP	FE	TCE
Dieta A (Ti3)	3,73 ± 1,96	no aplicable	26,07	1368,12	0,80 ± 0,42	0,36 ± 0,19	0,45 ± 0,21
Dieta B (D4 Optibream)	3,79 ± 0,00	no aplicable	33,94	1112,68	0,79 ± 0,00	0,26 ± 0,00	0,35 ± 0,00

Crecimiento e índices de crecimiento de los tratamientos Dieta A, B. Valores promedio ± error estándar de la media.

No hay diferencias significativas entre los parámetros analizados ($P < 0,05$)

* % de crecimiento desde la talla inicial, no evaluado estadísticamente ** Ingesta de proteína

ICA= Índice de conversión del alimento, TEP= Tasa de eficiencia de la proteína

ICAC= Índice de conversión de alimento corregido en humedad. En este caso no aplica por tener una humedad estándar del 8%

Estadísticamente no se encontraron diferencias, aunque es de destacar que el Índice de conversión del alimento (ICA) de uno de los grupos alimentado con la dieta A presenta un valor de 1,77 ya que uno de los peces del grupo creció muy por encima de la media. Y si bien el otro grupo presenta un ICA de 5,69. Lo cual, en el cómputo de la biomasa total, alimentación, etc. y una vez realizadas las medias entre tanques y tratamientos se diluye, lo cierto es que uno de los grupos no aceptó bien el pienso flotante Ti3, Dieta A, y el otro tampoco, pero un ejemplar aprovechó la coyuntura para comerse el pienso de los demás.

Si bien el peso inicial promedio de los peces era de $160,25 \pm 9,30$ g, este ejemplar de 208,20 g de peso inicial alcanzó el peso de 545,29 g al final del experimento. Esto supone un 46 % del incremento total del tanque. Por lo cual se tiene la certeza de que este ejemplar se alimentó muy por encima del resto de congéneres, comportamiento inusual en las especies de mugílidos ya que se suelen alimentar de manera menos agresiva que otras especies carnívoras, y tienen menor dispersión de talla al finalizar los ciclos de cultivo. Conclusión que podemos extraer tanto de nuestra experiencia, como del conocimiento de estas especies por otros integrantes del consorcio de investigación del proyecto. Datos de dispersión de los pesos que se muestran den la Figura 47 mediante un diagrama de puntos del peso inicial frente al peso final alcanzado, y en el que se marca con un círculo rojo el ejemplar de mayor crecimiento.

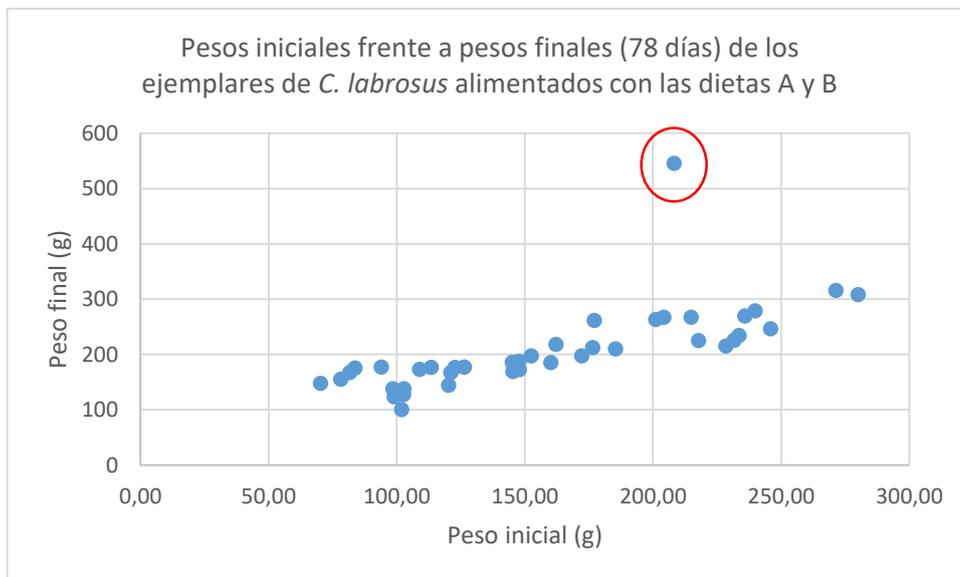


Figura 47. Pesos iniciales frente a los pesos finales de los ejemplares de *C. labrosus* alimentados durante 78 días con las Dietas A y B.

c) Parámetros inmunitarios

En los siguientes apartados se muestran los resultados de las actividades evaluadas de la inmunidad humoral y celular que fueron analizadas en los ejemplares sujetos a experimentación. Casi todas ellas muestran significaciones estadísticas ($P < 0,05$), tanto entre grupos, sobre todo entre los grupos de peces que fueron retados (PR) con *T. solaeae* al final del periodo de experimentación (Dietas A y B) y los no retados (PnR) (Dietas Reto A y Reto B).

En el caso concreto de este experimento el análisis estadístico se realizó entre las diferentes dietas (o grupos) y entre los PR y los PnR. Reiterando que son mínimas las diferencias entre estas dietas independientemente de la calidad del alimento y origen de las materias primas que arrojan resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$).

c.1 Parámetros de la inmunidad humoral

En los siguientes apartados se muestran las actividades de la inmunidad humoral que fueron analizadas en los ejemplares sujetos a experimentación.

c.1.1 Actividad enzimática del suero

De manera similar a como se ha hecho en el resto de experimentos. Casi todas ellas muestran significaciones estadísticas entre los grupos de peces que fueron retados (PR) o no (PnR) con *T. solaeae*.

De las actividades enzimáticas analizadas en el suero de los peces, se realizaron todas las actividades propuestas en el diseño experimental.

En general existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos de peces no retados en adelante (PnR) y los retados (en adelante PR), y la respuesta inmunitaria fue similar para todas las dietas, ya que ninguna dieta mejora o empeora considerablemente el nivel de actividad enzimática en general. En cada actividad analizada se muestran las consideraciones necesarias para entender los datos presentados.

c.1.1.a) Actividad peroxidasa del suero

En la Figura 48 se muestran los niveles de peroxidasa del suero después de un periodo de alimentación de 78 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto), tan solo existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los niveles de actividad enzimática entre los PnR y los PR, y como se muestra en la gráfica se produce un ascenso de la actividad peroxidasa en los PR independientemente de la dieta y del nivel de nutrientes aportados por estas. Los peces alimentados con la dieta A y B después de la infección, aunque no existan diferencias significativas entre las dietas tienen un similar comportamiento y tanto los animales de un grupo como de otro son capaces de responder adecuadamente a la exposición al patógeno *T. soleae* a corto plazo (24 h). Curiosamente en el mismo apartado del capítulo V en la experimentación con dorada (*S. aurata*) se puede comprobar como esta tendencia después de la infección en la actividad de peroxidasa del suero es la contraria y los niveles de actividad enzimática descienden. También este nivel en los PnR era mucho más elevado (aproximadamente 80 U/mL) y desciende aproximadamente a 50 U/mL.

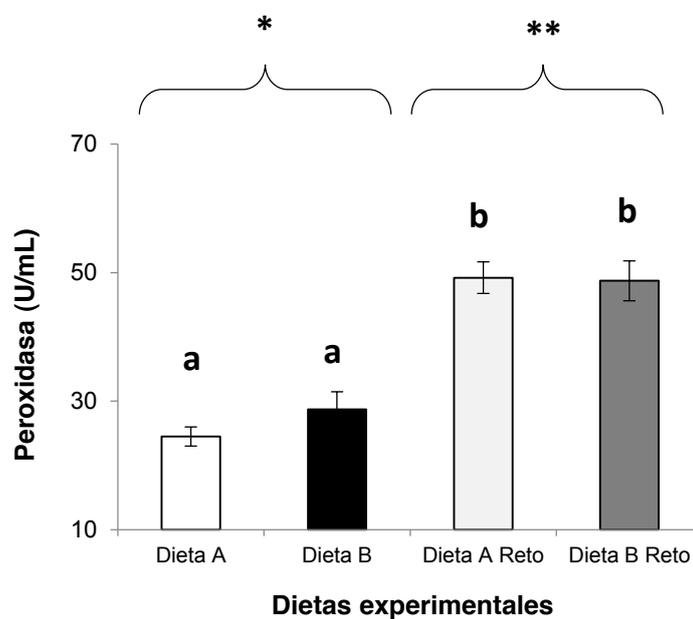


Figura 48. Niveles totales de peroxidasa en suero después de un periodo de alimentación de 78 días para los diferentes tratamientos: Peces no infectados (Dieta A y B) y Peces infectados (Dieta A Reto y Dieta B Reto) a las 24 horas de exposición al patógeno *T. soleae* por inyección intraperitoneal. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=20). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnI y PI (dieta e infección); los corchetes con * denotan diferencias significativas para la infección. ($P < 0,05$).

c.1.1.b) Actividad proteasa del suero

En la Figura 49 se muestran los niveles de proteasa del suero después de un periodo de alimentación de 78 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto), tan solo existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los niveles de los peces alimentados con la dieta B después de la exposición al patógeno respecto a la dieta A y a la dieta A después (PR). Aunque los niveles son muy similares antes y después (aproximadamente un 4 % en todas las dietas).

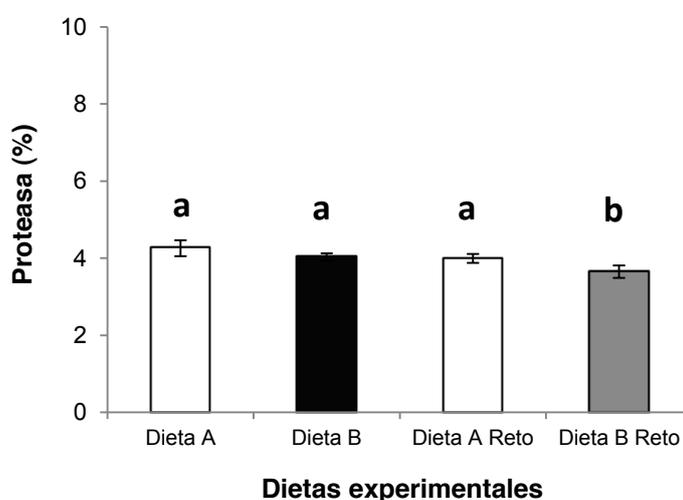


Figura 49. Niveles totales de proteasa en suero después de un periodo de alimentación de 78 días para los diferentes tratamientos: Peces no infectados (Dieta A y B) y Peces infectados (Dieta A Reto y Dieta B Reto) a las 24 horas de exposición al patógeno *T. soleae* por inyección intraperitoneal. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ($n=20$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnI y PI (dieta e infección); los corchetes con * denotan diferencias significativas para la infección. ($P < 0,05$).

c.1.1.c) Antiproteasa del suero

En la Figura 50 se muestran los niveles de antiproteasa del suero después de un periodo de alimentación de 78 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto), tan solo existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los niveles de los peces alimentados con la dieta B después de la exposición al patógeno respecto a la dieta A y a la dieta A después (PR). Aunque los niveles son muy similares antes y después. Misma diferencia que se mostraba en la Figura X anterior para la proteasa en suero.

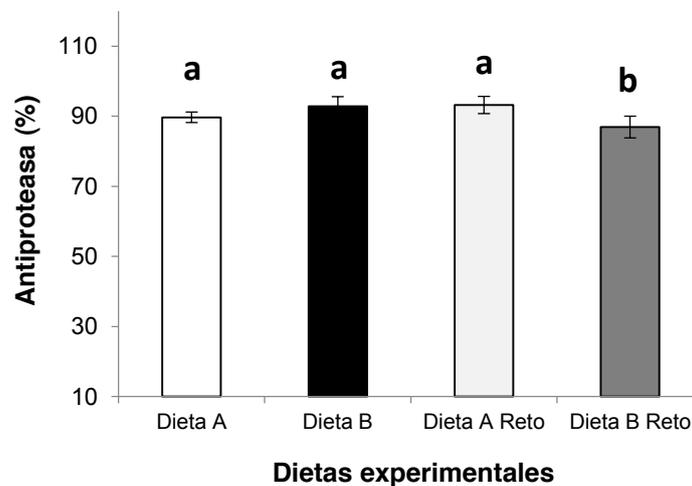


Figura 50. Niveles totales de antiproteasa en suero después de un periodo de alimentación de 78 días para los diferentes tratamientos: Peces no infectados (Dieta A y B) y Peces infectados (Dieta A Reto y Dieta B Reto) a las 24 horas de exposición al patógeno *T. soleae* por inyección intraperitoneal. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=20). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnI y PI (dieta e infección); los corchetes con * denotan diferencias significativas para la infección. ($P < 0,05$).

c.1.1.d) Actividad lisozima del suero

En la Figura 51 se muestran los niveles de lisozima del suero ($\mu\text{g/mL}$ equivalente de actividad HEWL) después de un periodo de alimentación de 78 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto), tan solo existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los niveles de los peces alimentados con la dieta B antes de la exposición al patógeno respecto a la dieta A antes y a la dieta A y B después (PR). Los peces alimentados con la dieta B, justo después de la infección son capaces de responder de manera adecuada al patógeno. Mientras que los peces de la dieta A mantienen los niveles altos de actividad de la lisozima previos a la infección.

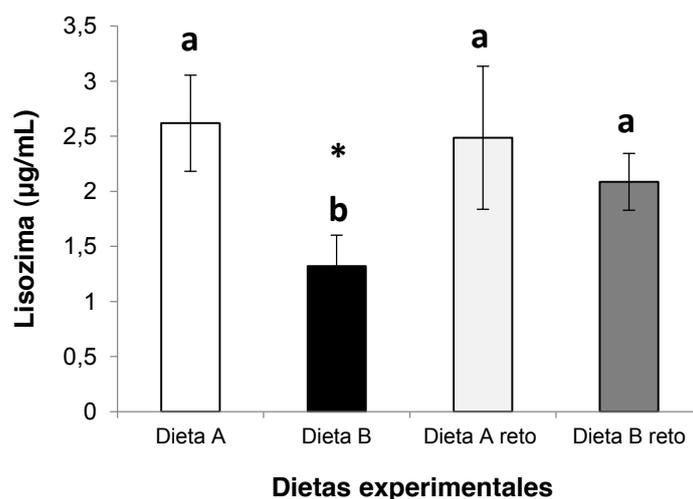


Figura 51. Niveles totales de lisozima en suero después de un periodo de alimentación de 78 días para los diferentes tratamientos: Peces no infectados (Dieta A y B) y Peces infectados (Dieta A Reto y Dieta B Reto) a las 24 horas de exposición al patógeno *T. soleae* por inyección intraperitoneal. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ($n=20$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre Pnl y PI (dieta e infección); los corchetes con * denotan diferencias significativas para la infección. ($P < 0,05$).

c.1.2) Actividad enzimática del moco de la piel

De las actividades enzimáticas analizadas del moco de la piel de los peces, se analizaron todas las actividades propuestas en el diseño experimental pero no se detectó la actividad antiproteasa. De manera similar a como se ha hecho en el resto de experimentos se muestran de manera ordenada. Siendo pocas las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) encontradas entre los niveles de actividad de diferentes tratamientos (Dietas A, B), y PR o PnR.

c.1.2.a) Actividad peroxidasa del moco de la piel

En la Figura 52 se muestran los niveles de peroxidasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 78 días y para los diferentes tratamientos (dietas A y B e infección). La dieta B post infección presenta diferencias significativas frente al resto, A y B en los PnR y A en los PR ($P < 0,05$). Estos niveles son bastante más bajos que los mostrados en el capítulo IV para la dorada (*S. aurata*) que después de la exposición al patógeno llegan a alcanzar aproximadamente unos 30 U/mL. Los niveles mostrados en esta Figura 4 son muy similares a los del capítulo V.

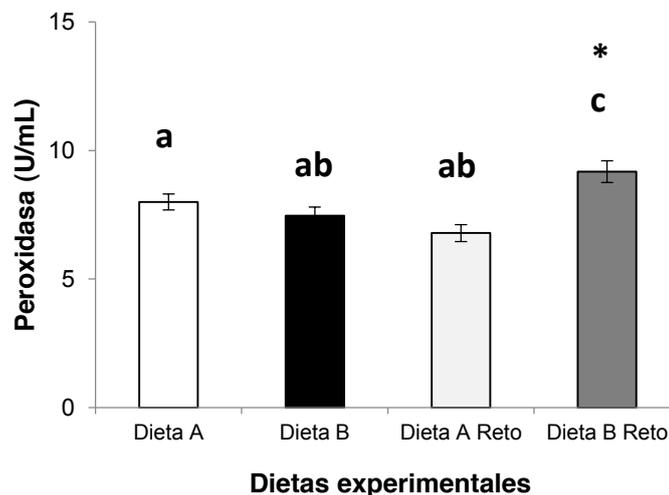


Figura 52. Niveles totales de peroxidasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 78 días para los diferentes tratamientos: Peces no infectados (Dieta A y B) y Peces infectados (Dieta A Reto y Dieta B Reto) a las 24 horas de exposición al patógeno *T. soleae* por inyección intraperitoneal. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=20). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnI y PI (dieta e infección); los corchetes con * denotan diferencias significativas para la infección. ($P < 0,05$).

c.1.2.b) Actividad proteasa del moco de la piel

En la Figura 53 se muestran los niveles de proteasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 78 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto), No existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los factores analizados, en primer lugar, ni entre los niveles de actividad de los peces PR y PnR, ni entre los niveles de los peces alimentados con las diferentes dietas.

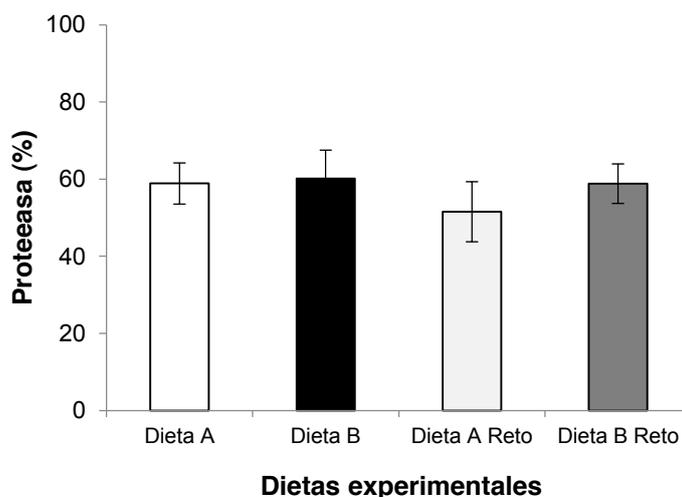


Figura 53. Niveles totales de proteasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 78 días para los diferentes tratamientos: Peces no infectados (Dieta A y B) y Peces infectados (Dieta A Reto y Dieta B Reto) a las 24 horas de exposición al patógeno *T. soleae* por inyección intraperitoneal. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=20). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnI y PI (dieta e infección); los corchetes con * denotan diferencias significativas para la infección. ($P < 0,05$).

c.1.2.c) Actividad antiproteasa del moco de la piel

Esta actividad no fue detectada en el moco de la piel, aunque se repitió la medida de la actividad 3 veces.

c.1.2.d) Actividad lisozima del moco de la piel

En la Figura 54 se muestran los niveles de lisozima del moco de la piel ($\mu\text{g/mL}$ equivalente de actividad HEWL) después de un periodo de alimentación de 78 días y para los diferentes tratamientos (dietas A, B e infección). Existen resultados estadísticamente significativos entre las dietas, y los PR y PnR ($P < 0,05$).

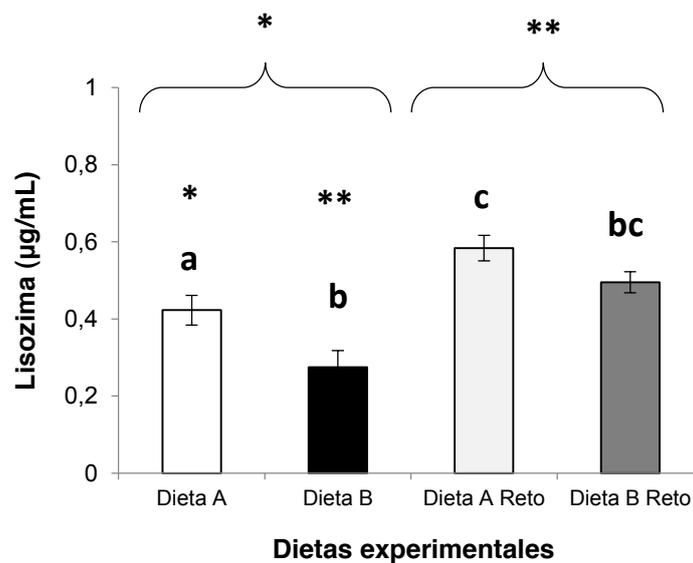


Figura 54. Niveles totales de lisozima del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 78 días para los diferentes tratamientos: Peces no infectados (Dieta A y B) y Peces infectados (Dieta A Reto y Dieta B Reto) a las 24 horas de exposición al patógeno *T. soleae* por inyección intraperitoneal. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ($n=20$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnI y PI (dieta e infección); los corchetes con * denotan diferencias significativas para la infección. ($P < 0,05$).

c.1.2.e) Cuantificación de proteínas en el moco de la piel

En la Figura 55 se muestran los niveles de proteína del moco de la piel (mg/mL) después de un periodo de alimentación de 78 días y para los diferentes tratamientos (A, B e infección). Siendo los niveles de los peces alimentados con la dieta con mayor proteína (dieta b) algo más elevados y estadísticamente significativos ($P < 0,05$). Estos niveles se podrían considerar en general normales entre los presentados en los demás capítulos, aproximadamente entre 0,8 mg/mL a 1,4 mg/mL. En experimentos anteriores para *C. labrosus* (Vilchez-Gomez, 2017). Los valores presentados se encontraban en un rango aproximadamente entre 1,4 y 1,8 mg/mL. Siendo quizás algo superiores los presentados en el Capítulo IV para dorada (*S. aurata*) entre 1,2 y 1,4 mg/mL.

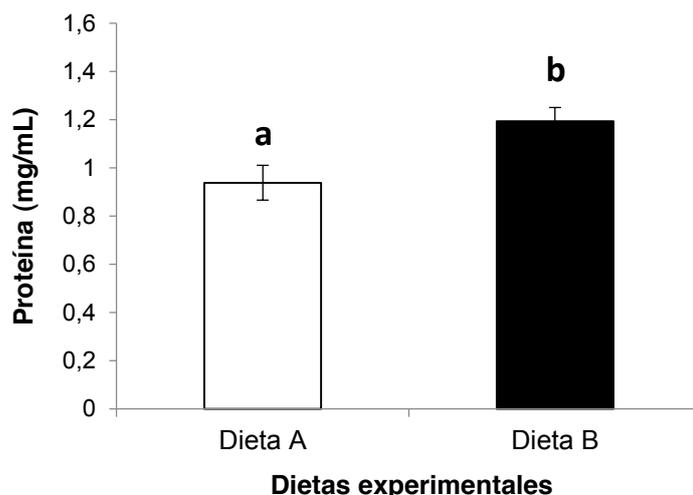


Figura 55. Niveles totales de proteína del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 78 días para los diferentes tratamientos: Peces no infectados (Dieta A y B) y Peces infectados (Dieta A Reto y Dieta B Reto) a las 24 horas de exposición al patógeno *T. soleae* por inyección intraperitoneal. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=20). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre Pnl y PI (dieta e infección); los corchetes con * denotan diferencias significativas para la infección. ($P < 0,05$).

d) Parámetros de la inmunidad celular

En los siguientes apartados se muestran las actividades de la inmunidad celular que fueron analizadas en los ejemplares sujetos a experimentación. En general la habilidad y la capacidad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico después de la exposición al patógeno desciende de manera significativa, mientras que la explosión respiratoria no fue detectada y la peroxidasa en leucocitos de riñón cefálico aumenta ligeramente y de manera estadísticamente significativa. ($P < 0,05$). Aunque la tendencia de todas estas actividades en dorada (*S. aurata*) había sido a creciente después de la infección como se muestra en el capítulo IV. Valores que están mediados por la infección y no por las dietas, ya que, entre los peces alimentados con las dietas A y B, antes y después de la infección no existen diferencias estadísticamente significativas, de manera similar a lo que ha sucedido en las demás experiencias (Capítulo IV).

d.1 Actividad peroxidasa de los leucocitos de riñón cefálico

En la Figura 56 se muestra la actividad peroxidasa de los leucocitos de riñón cefálico después de un periodo de alimentación de 78 días y para los diferentes tratamientos (dietas y reto), e independientemente de la dieta, las diferencias estadísticamente significativas se muestran por los valores de esta actividad antes y después de la infección. ($P < 0,05$)

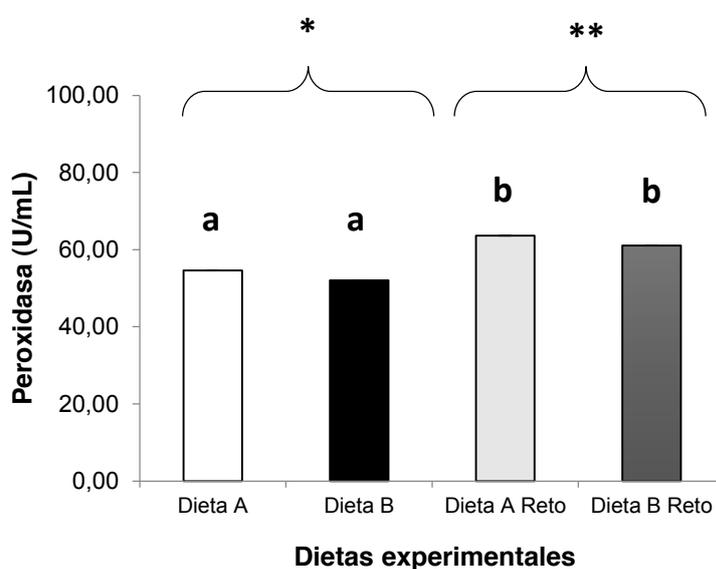


Figura 56. Niveles totales de actividad peroxidasa en leucocitos del riñón cefálico después de un periodo de alimentación de 78 días para los diferentes tratamientos: Peces no infectados (Dieta A y B) y Peces infectados (Dieta A Reto y Dieta B Reto) a las 24 horas de exposición al patógeno *T. soleae* por inyección intraperitoneal. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ($n=20$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre Pnl y PI (dieta e infección); los corchetes con * denotan diferencias significativas para la infección. ($P < 0,05$).

d.2 Explosión respiratoria de los leucocitos de riñón cefálico

Esta actividad no fue detectada aun repitiéndose la medida tres veces.

d.3 Actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico

La habilidad fagocítica se define como el porcentaje de células de levaduras marcadas (con FITC) con una o más bacterias ingeridas dentro de la población celular fagocítica, mientras que la capacidad fagocítica se define como la intensidad media de fluorescencia. En la Figura 57 se muestran los valores de la capacidad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico, así como en la Figura 58, los valores de la habilidad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico.

Así tanto la habilidad (Fig. 57) como la capacidad (Fig. 59) fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico desciende para las lisetas (*C. labrosus*) alimentados con las dietas A y B. Significación estadística ($P < 0,05$) que se muestra con corchetes y *, **. La respuesta de los peces alimentados con las diferentes dietas resulta similar o en bloque, no existiendo diferencias entre dietas salvo en la habilidad fagocítica de los peces alimentados con la dieta B que es algo más baja y estadísticamente diferente.

Por lo demás, los niveles de capacidad fagocítica (Fig. 57) y de habilidad (Fig. 59) de los leucocitos de riñón cefálico de los peces presentan un descenso de la actividad fagocítica y una mala respuesta tras la exposición al patógeno.

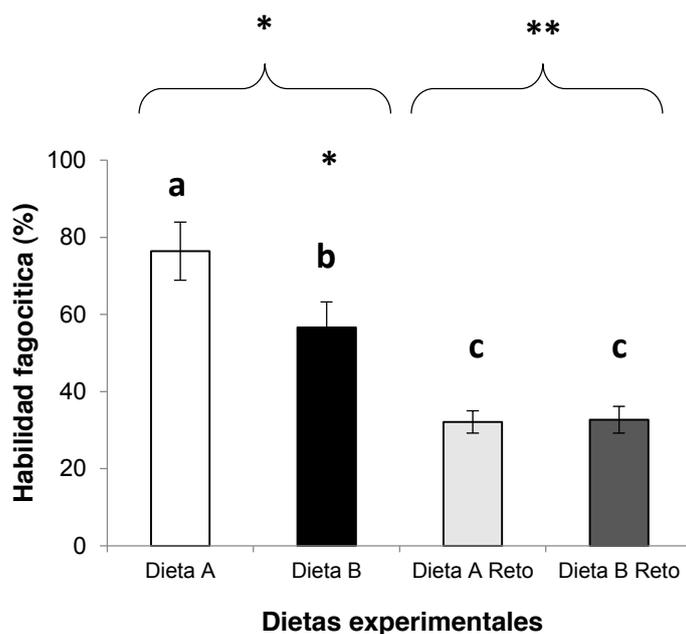


Figura 57. Niveles totales de habilidad fagocítica en leucocitos del riñón cefálico después de un periodo de alimentación de 78 días para los diferentes tratamientos: Peces no infectados (Dieta A y B) y Peces infectados (Dieta A Reto y Dieta B Reto) a las 24 horas de exposición al patógeno *T. soleae* por inyección intraperitoneal. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=20). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnI y PI (dieta e infección); los corchetes con * denotan diferencias significativas para la infección. (P < 0,05).

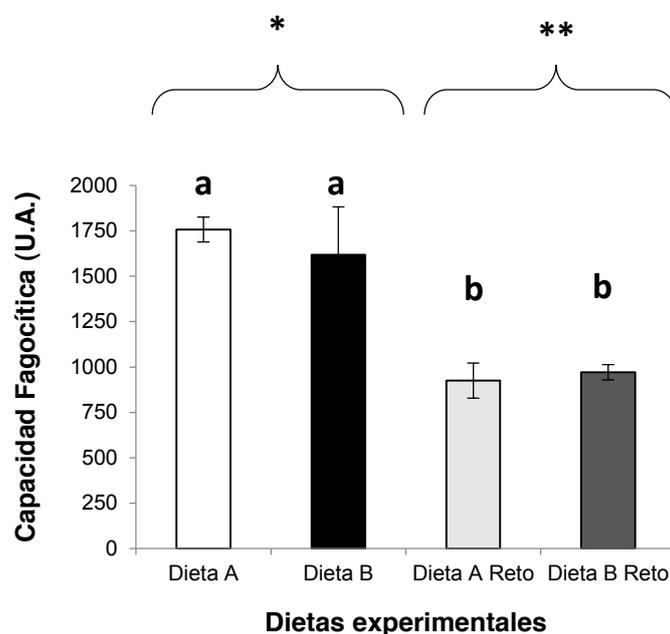


Figura 58. Niveles totales de capacidad fagocítica en leucocitos del riñón cefálico después de un periodo de alimentación de 78 días para los diferentes tratamientos: Peces no infectados (Dieta A y B) y Peces infectados (Dieta A Reto y Dieta B Reto) a las 24 horas de exposición al patógeno *T. soleae* por inyección intraperitoneal. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=20). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento dieta; * denota diferencias significativas entre PnI y PI (dieta e infección); los corchetes con * denotan diferencias significativas para la infección. (P < 0,05).

VI.4. Discusión

De los resultados obtenidos en el experimento debemos diferenciar por su naturaleza en dos partes. La primera parte o relativa al crecimiento, y una segunda relativa a la inmunidad humoral y celular, antes y después de exponer a los ejemplares de liseta a un reto por inyección intraperitoneal de *T. soleae*.

Respecto del crecimiento, no se puede decir que haya sido malo, para ninguna de las dietas, ya que los ejemplares (a diferencia de los otros experimentos eran de una talla muy superior). Así, el experimento se realiza partiendo de un peso medio inicial de $160,25 \pm 9,30$ g y contando con pocos ejemplares de esta talla (se utilizaron todos los disponibles) para realizar un experimento en el que se hubieran incluido otras dietas. Y el crecimiento en %, la eficiencia o la TCE, podemos decir que son habituales para este tamaño de pez y algo peores para la dieta con mayor contenido de proteína y diseñada un para un carnívoro, sin que existan diferencias significativas estadísticamente.

Como hemos expuesto en los resultados del crecimiento, un ejemplar sacó provecho de la mala aceptación por los demás del pienso flotante Ti3 o dieta A, siendo este comportamiento inusual —y quizás debido a una mala aceptación del pienso flotante—. Comunicación personal de D. Juan A. Calderón. Y aunque en las tallas más pequeñas no ha existido ese problema, ni ha ocurrido anteriormente en las Instalaciones del CPIFP Marítimo Zaporito donde se utiliza ese mismo pienso para los mugílidos. No debemos dejar de exponer lo sucedido, aunque las medias aritméticas diluyan este exceso de ingesta y de crecimiento. Esta mala aceptación del alimento flotante ha sido evaluada recientemente por un estudio en el que nuestras apreciaciones del día a día con mugílidos han sido confirmadas, mostrando la tendencia de estos animales a comer en el medio de la columna de agua o en el fondo, y evitando la superficie (Ramos-Júdez & Duncan, 2022).

La dispersión de talla de los animales en crianza no es un factor que sea ajeno al acuicultor o al investigador en acuicultura, o en general al ganadero. Y en parte es una característica que se ha utilizado desde antiguo para la mejora de las razas ganaderas, separando colas (animales que no crecen) de cabezas (animales que crecen en exceso). El problema es determinar con certeza y es difícil cuando se produce esta diferencia en el crecimiento por la ingesta o por las cualidades genéticas o de estirpe del animal. Tampoco le interesa al acuicultor tener unos animales que crezcan muy por encima de la media y puedan depredar en las etapas

iniciales de los cultivos a sus congéneres (en el caso de la acuicultura de especies carnívoras). Si esta diferencia de talla se hubiera producido en un experimento con dorada, o con lubina y los peces hubieran estado alimentados como es el caso a una baja tasa diaria de alimentación estamos seguros de que se hubieran producido agresiones y canibalismo por parte de este ejemplar hacia sus congéneres, y probablemente se hubiera trastocado el experimento por mortalidad. No es difícil encontrarse en los acuarios lubinas que han muerto asfixiadas al intentar tragarse congéneres de similar tamaño.

Pero las excepciones están para confirmar la regla y aunque este comportamiento es extraño y no habitual para la especie, lo es hasta que suceda algo similar a lo que ha sucedido en este tanque. Tal y como se puso de manifiesto en el capítulo III, la dispersión en el crecimiento es un factor a tener muy en cuenta tanto por el acuicultor como el investigador. Lo cual nos reafirma en la necesidad de mayor precisión a la hora de mostrar los pesos, y datos de crecimiento de las especies en los estudios, tanto en los nutricionales como en los inmunológicos al igual que reclaman otros investigadores de reconocida trayectoria investigadora (Du & Turchini, 2021). Si bien, es de sobra conocida la dispersión de tallas en los cultivos mostrar estos datos no es habitual. Datos de dispersión de los pesos que se han mostrado en la Figura 47 mediante un diagrama de puntos del peso inicial frente al peso final alcanzado, y en el que se marca con un círculo rojo el ejemplar de mayor crecimiento.

Los datos de crecimiento de los demás ejemplares se pueden considerar similares entre ellos, y una vez realizada una regresión lineal sobre los pesos iniciales frente a los finales de los ejemplares (todos los peces y todos los grupos), (Fig. 47) estas regresiones arrojan las siguientes ecuaciones:

a) Incluyendo el ejemplar señalado con el círculo rojo: $Y = 0,8937 x + 64,726$ $R^2 = 0,4912$

b) Sin incluir el ejemplar señalado con el círculo rojo: $Y = 0,7845 x + 74,543$ $R^2 = 0,7943$

Siendo datos absolutamente normales para la evolución del crecimiento de la liseta los de la ecuación b). E independientemente de la dispersión inicial que existía ajustados a lo razonable para el crecimiento reiteramos similar de todos los individuos. Sin que existan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los parámetros analizados. Lo que a veces nos recuerda que la estadística no puede suplir a la lógica. Así son pocos los trabajos en nutrición que analizan estadísticamente el parámetro dispersión, y se asume como un factor

existente reiteramos e inevitable por las diferencias entre individuos, y no se analiza (en parte porque no se puede de manera sencilla individualizar la ingesta individual cuando se trabaja con grupos de peces). Normalmente se asume como cierta una ingesta promedio lo cual puede tener (y este caso extremo lo confirma) mucha importancia a la hora de evaluar los resultados de los experimentos.

Este acontecimiento indeseable e inevitable a partes iguales cuando se trabaja con peces, también nos pone de manifiesto que el crecimiento de los mugílidos puede ser igual o comparable con otras tradicionalmente cultivadas en el Mediterráneo, o incluso con salmónidos. Especies de tasas de crecimiento habitualmente aceptadas en general por los investigadores como mayores que las de los mugílidos. Aunque los datos sobre este ejemplar nos confirman que creció a una tasa no desdeñable de 4,32 g día de crecimiento absoluto (Incremento de peso/día), y un TCE de 1,46. O un crecimiento en porcentaje desde el inicio y día de un 2,08 %. Lo cual es más que significativo y no necesita de estadística para comprobar que triplica los valores de TCE de su grupo incluso estando este ejemplar incluido. TCE para la dieta A de $0,45 \pm 0,21$. Y teniendo en cuenta, que los peces no fueron alimentados todos los días (en total solo 66 de 78 días). Lamentablemente reiteramos no se pueden individualizar los datos de la ingesta como sucede con el resto de experimentos en acuicultura. Y el cálculo contrario deducir la ingesta desde el crecimiento del ejemplar tampoco es posible con los datos que hay para las especies. Aspectos en los que se profundizará en la discusión general.

En lo referente a la inmunidad humoral y celular, de la liseta (*C. labrosus*) antes y después de exponer a los ejemplares a un reto por inyección intraperitoneal de *T. soleae*. Exponer que los niveles de lisozima del moco de la piel presentados en la Figura 54 ($\mu\text{g/mL}$ equivalente de actividad HEWL) y del suero de los *C. labrosus* son similares en cantidad, con los presentados en el capítulo V, aunque son algo más elevados en suero (Capítulo V, entre 0,5 y 1 $\mu\text{g/mL}$ equivalente de actividad HEWL, y en este capítulo entre 1,2 y 2,6 $\mu\text{g/mL}$ equivalente). Los valores presentados en el Capítulo IV para dorada (*S. aurata*) son muy superiores (entre 5,5 y 6,9 $\mu\text{g/mL}$ equivalente) a los obtenidos para *C. labrosus* en todas las experiencias realizadas

Y decir que la respuesta ha sido menor a la esperada y menor a la que se ha presentado con anterioridad para la dorada (*S. aurata*) en el capítulo IV, frente al mismo tipo de reto y con la misma bacteria. Aquí podemos diferenciar no solo entre las especies, también en el

tamaño de los ejemplares, a los que se les inoculó una dosis sub-letal en la búsqueda de la activación y respuesta del sistema inmunitario (y no tendente a causarles la muerte a corto plazo o una infección aguda). En el otro experimento en que ha participado el doctorando con la misma bacteria, pero con otra especie, la anguila europea (Conforto et al., 2021), los peces también tenían una talla comparable a la de este experimento (peso inicial $146,63 \pm 17,96$ g) y en ambos casos la respuesta ha sido menor, frente a la registrada para las doradas, de peso inicial $12,86 \pm 0,28$ g — datos mostrados en este experimento y comparados con el capítulo IV *vide supra*—

Por un lado la respuesta de los ejemplares a la exposición a un patógeno va a depender de la ruta de inoculación, bien mediante baño o bien mediante inyección intraperitoneal, (Avedaño-Herrera et al., 2006a, 2006b) pero no es sencillo establecer cuál es el mejor método, ni tampoco es labor de este trabajo discutirlo en profundidad. Lo que sí podemos comprobar, y sobre todo en los trabajos realizados en el desarrollo de este doctorado, es que la inoculación mediante inyección intraperitoneal si ha activado de manera general tanto en los ejemplares de dorada (capítulo IV) como en los ejemplares de liseta (este capítulo), como en los ejemplares anguila el sistema inmunitario de los animales (Conforto et al., 2021). Discrepando de las afirmaciones de Avedaño-Herrera y colaboradores en cuanto a que la inyección intraperitoneal, o el baño cuando no hay heridas no son un buen modo de inoculación y generación de la enfermedad. Así otros estudios recogen una activación del sistema inmunitario por ejemplo en el lenguado senegalés mediante una exposición por baño (Escribano et al., 2020; Guardiola et al., 2019) y sus efectos sobre el sistema inmunitario. Y factores como la talla de los ejemplares, o la alimentación no son habitualmente analizados en la patogénesis ni en la etiología de la enfermedad.

Aun teniendo en cuenta que *T. solae* es una bacteria que afecta fundamentalmente a la piel con heridas, la vía de entrada al huésped (como en la mayoría de los patógenos en acuicultura no es clara y puede deberse más que a una sola vía, a un conjunto de causas). El contacto con otros animales (salvajes que pudieran estar enfermos y no vacunados), el baño (presencia en el agua), o la presencia de reservorios de bacterias y virus en las instalaciones (incrustaciones en redes, jaulas, elementos filtrantes, etc.), o la exposición vía alimentación (por ejemplo, canibalismo sobre un animal enfermo) no pueden descartarse en su totalidad como origen de la enfermedad y menos cuando tenemos poco control sobre el factor agua que

es inseparable de los peces. El factor canibalismo es un elemento de importancia y a considerar en el caso de los cultivos de especies carnívoras.

Por otro lado, lo que no podemos pretender es que la exposición a una dosis menor de patógeno, y que una ruta de contagio diferente causen los mismos efectos, con la misma rapidez o gravedad. Así otros estudios recogen una activación del sistema inmunitario de manera más lenta cuando la presentación del patógeno se realiza por baño (Escribano et al., 2020; Guardiola et al., 2019), o diferente comparando entre rutas de infección (Ferreira et al., 2019). Más lenta por baño al igual que ha sucedido con los peces más grandes (*C. labrosus* y *A. anguilla*). Mientras que, para los ejemplares de dorada del capítulo IV de talla final menor a 17 g la cantidad de patógeno inoculada (igual que en los peces grandes) provocó una reacción aguda en el corto plazo. Por lo tanto, estos animales han sido capaces de montar una respuesta inmunitaria adecuada en el corto plazo discriminando entre lo propio y lo ajeno (Danilova, 2006; Meseguer, 2017). Lo mismo que Avendaño-Herrera et al., 2006b argumenta que ni el baño, ni la inyección intraperitoneal son métodos efectivos para replicar la enfermedad, nuestros datos presentados, y los de los demás estudios publicados permiten afirmar lo contrario.

Avendaño y colaboradores también recogen en su trabajo que factores como el uso de microcosmos bajo condiciones naturales «prueban el efecto inhibitorio de la microbiota del agua en el crecimiento y supervivencia de la bacteria» y un posible efecto positivo de la microbiota autóctona que lisa las células bacterianas afectando a la reproducción y supervivencia del patógeno. Aspecto que entendemos complejo por la propia diversidad de la microbiota del agua y de la microbiota intestinal, etc. (Cámara Ruiz, 2022), y sobre todo en instalaciones tanto de investigación como de cultivo de peces en la que nos es imposible controlar todos los factores, y menos aún uno tan complejo como las interacciones microbiota del agua y de los animales con el patógeno y con la salud del huésped. Por este motivo entendemos mucho más razonable el uso de la inyección intraperitoneal que el baño para los objetivos de este experimento y de los otros trabajos realizados —capítulo IV *vide supra*—, o Conforto et al., 2021. Así a corto plazo y mediante esta metodología nos es posible extraer conclusiones sobre el estado inmunitario de los peces, y su relación con la alimentación. Siendo la mayor limitación como siempre las limitaciones físicas de las instalaciones que limitan los diseños experimentales e impiden tener más grupos experimentales, realizar experimentos de mayor duración, como por ejemplo la imposibilidad de mantener grupos de peces retados y no retados durante periodos en los que se les suministren diferentes tipos de

alimentación o se modifiquen las condiciones de cultivo, temperaturas, salinidades, etc. No podemos negar que nos hubiera gustado poder mantener dichos grupos durante un periodo de tiempo post-infección más largo y poder evaluar los efectos no solo a corto plazo, sino también de la migración del patógeno del cuerpo del animal a la piel, si esta se produce, etc. Imposible reiteramos por las limitaciones físicas de las instalaciones.

De todos modos, es extraer conclusiones generales sobre una especie de experimentos puntuales es como poco intrépido, y más en una especie como el *C. labrosus* o los mugílidos en general a la que la ciencia de la nutrición o la inmunología ha prestado poca atención. Así se desconoce si además del presente para *C. labrosus* haya algún otro estudio que haya realizado una inoculación de patógenos por baño, o inyección intraperitoneal, y luego evaluado el estado del sistema inmunitario.

No tenemos duda de que la inoculación ha producido un aumento de la actividad peroxidasa tanto en suero, moco de la piel como en la actividad peroxidasa de los leucocitos del riñón cefálico. Mientras que el resto de actividades evaluadas de la inmunidad humoral tanto en suero como en moco presentan unos niveles de actividad planos en cuanto a la inoculación que se lo achacamos a la dosis y tamaño de los peces. Por el contrario, la actividad de la lisozima si se activa e incrementa sus niveles tanto en la dieta B en suero, como en el moco de la piel. El incremento de estas actividades parece más que suficiente como para mantener esta afirmación de que la ruta de presentación del patógeno (vía inyección intraperitoneal) ha alterado el equilibrio inmunitario humoral de los animales. Por otra parte, también se produce un brusco descenso de la inmunidad celular en cuanto a la capacidad y habilidad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico. No así en la peroxidasa de los leucocitos que se activa de igual manera que su contraparte en suero y moco de la piel pareciendo que esta actividad es la primera que se activa a corto plazo tras la exposición al patógeno.

Es quizás este descenso acusado de la actividad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico el que tenga una más compleja interpretación, mientras que la respuesta humoral se puede considerar normal y esperada en los ejemplares de liseta, para los ejemplares de dorada (capítulo IV) la activación del sistema inmunitario celular se produce en el corto plazo a las 24 horas, y todas las dietas responden por igual, y la exposición al patógeno es suficiente para activar la respuesta celular, independientemente del factor ampliamente comentado de la talla y cantidad de patógeno.

La respuesta de ambas actividades es similar, para todos los peces alimentados con las dietas independientemente de la alimentación recibida. Así, y de manera diferente a los datos presentados en el capítulo IV, no se repite el patrón de ascenso post exposición a la bacteria de la capacidad fagocítica.

Para la explicación de la falta de reacción de la capacidad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico nos inclinamos más por una implicación de la dieta. Tanto la dieta A como la B tienen un bajo ratio ω -3 / ω -6 y con mucha más energía de lo que para la especie es habitual. Por lo que este descenso de la habilidad y capacidad fagocítica puede obedecer a una deficiente calidad en los ácidos grasos de las dietas para una especie cuya alimentación natural incluye una elevada cantidad de fitoplancton y zooplancton (Cardona, 2016; Cardona Pascual, 1989; Gisbert et al., 1995), y a una desregulación en este sentido de la capacidad y habilidad fagocítica (Al-Khalifa et al., 2012; Gutiérrez et al., 2019; Pisani et al., 2009; Tocher, 2015).

VI.5 Bibliografía

- Al-Khalifa, H., Givens, D. I., Rymer, C., & Yaqoob, P. (2012). Effect of n-3 fatty acids on immune function in broiler chickens. *Poultry Science*, *91*(1), 74–88. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01693>
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A. E., & Magariños, B. (2006a). A challenge model for *Tenacibaculum maritimum* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, *29*(6), 371–374. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00712.x>
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A., & Magariños, B. (2006b). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: A review. *Diseases of Aquatic Organisms*, *71*, 255–266. <https://doi.org/10.3354/dao071255>
- Cámara Ruiz, M. (2022). *Microbiota como bioindicador de salud en especies marinas de interés acuícola* [Doctoral Thesis, Univesidad de Murcia. Facultad de Biología.]. <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/120263>
- Cardona, L. (2016). Food and Feeding of Mugilidae. In D. Crosetti, *Biology, Ecology and Culture of Grey Mulletts (Mugilidae)*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19927-17>
- Cardona Pascual, L. (1989). *Alimentación de los juveniles de Liza aurata Risso (Osteichthyes, Mugilidae) en la albufera d'es Grao (Menorca)*. <http://portalrecerca.csuc.cat/36124910>
- Conforto, E., Vilchez-Gomez, L., Parrinello, D., Parisi, M. G., Esteban, M. Á., Cammarata, M., & Guardiola, F. A. (2021). Role of mucosal immune response and histopathological study in European eel (*Anguilla anguilla* L.) intraperitoneal challenged by *Vibrio anguillarum* or *Tenacibaculum soleae*. *Fish & Shellfish Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.05.011>
- Danilova, N. (2006). The evolution of immune mechanisms. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *306B*(6), 496–520. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21102>
- Du, Z., & Turchini, G. M. (2021). Are we actually measuring growth?—An appeal to use a more comprehensive growth index system for advancing aquaculture research. *Reviews in Aquaculture*, raq.12604. <https://doi.org/10.1111/raq.12604>
- Escribano, M. P., Ramos-Pinto, L., Fernández-Boo, S., Afonso, A., Costas, B., & Guardiola, F. A. (2020). Mucosal immune responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles after *Tenacibaculum maritimum* challenge: A comparative study between ocular and blind sides. *Fish & Shellfish Immunology*, *104*, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.080>

- Ferreira, I., Costa, J. Z., Thompson, K. D., Valero, Y., Cuesta, A., Baptista, T., Ángeles Esteban, M., & Guardiola, F. A. (2019). Differential immune responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) upon nodavirus infection by bath or intramuscular injection. *Fish & Shellfish Immunology*, *91*, 393. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.080>
- Gisbert, E., Cardona, L., & Orvay, F. (1995). Alimentación de los alevines de mugílidos en el delta del Ebro. *Miscel·lània Zoològica; Vol.: 18*.
- Guardiola, F. A., Mabrok, M., Machado, M., Azeredo, R., Afonso, A., Esteban, M. A., & Costas, B. (2019). Mucosal and systemic immune responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) bath challenged with *Tenacibaculum maritimum*: A time-course study. *Fish & Shellfish Immunology*, *87*, 744–754. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.015>
- Gutiérrez, S., Svahn, S. L., & Johansson, M. E. (2019). Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(20), 5028. <https://doi.org/10.3390/ijms20205028>
- Meseguer, J. (2017). *Clase magistral: La evolución de sistema inmunitario. Impartida por D. J. Meseguer. Máster Universitario en Gestión de Recursos Pesqueros y Acuicultura: Universidad de Murcia.*
- Pisani, L. F., Lecchi, C., Invernizzi, G., Sartorelli, P., Savoini, G., & Ceciliani, F. (2009). In vitro modulatory effect of ω -3 polyunsaturated fatty acid (EPA and DHA) on phagocytosis and ROS production of goat neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *131*(1), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.03.018>
- Ramos-Júdez, S., & Duncan, N. (2022). Feeding habits and the influence of pellet diameter on the feeding responses of the flathead grey mullet (*Mugil cephalus*) in captivity. *Animal Feed Science and Technology*, *290*, 115368. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115368>
- Tocher, D. R. (2015). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*, *449*, 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.010>
- Vilchez-Gomez, L. (2017). *Evaluación de dietas en mugílidos. Trabajo fin de Máster.* [Master Thesis Máster Universitario en Gestión de Recursos Pesqueros y Acuicultura. Facultad de Biología.]. Universidad de Murcia.

Sección segunda

Capítulo VII. Evaluación del crecimiento y del estado inmunitario de la liseta (*Chelon labrosus*) alimentada con dietas basadas en levaduras de desecho, diferentes perfiles de ácidos grasos, y mantenidas en diferentes porcentajes de salinidad (36 ‰ y 0 ‰)



Solea senegalensis (Kaup, 1958)

latín *solea* 'sandalia' y 'lenguado', forma; latín *senegalensis* 'de Senegal', procedencia (Barriuso, 1986)

Salina N^o S^a de los Desamparados (Puerto Real), 2004 (Foto: A. M. Arias)

Derechos cedidos por M. Arias, www.ictieterm.es

Sección segunda

Evaluación biológica de la valorización de subproductos de la industria cervecera en piensos para acuicultura

Capítulo VII. Evaluación del crecimiento y de estado inmunitario de la liseta (*Chelon labrosus*) a diferentes salinidades alimentada con dietas basadas en levaduras de desecho

VII.1 Resumen y objetivos

VII.2 Materiales y métodos

VII.2.1 Peces

VII.2.2 Dietas

VII.3.3 Diseño experimental

VII.4.4 Análisis estadístico

VII.3 Resultados

a) Comportamiento, canibalismo y mortalidad

b) Crecimiento

c) Parámetros de la inmunidad

c.1. Parámetros de la inmunidad humoral

c.1.1) Actividad enzimática del suero

c.1.1.a) Actividad peroxidasa del suero

c.1.1.b) Actividad proteasa del suero

c.1.1.c) Actividad antiproteasa del suero

c.1.1.d) Actividad lisozima del suero

c.1.2) Actividad enzimática del moco de la piel

c.1.2.a) Actividad peroxidasa del moco de la piel

c.1.2.b) Actividad proteasa del moco de la piel

c.1.2.c) Actividad antiproteasa del moco de la piel

c.1.2.d) Actividad lisozima del moco de la piel

c.1.2.e) Cuantificación de proteínas

d) Parámetros de la inmunidad celular

d.1 Actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico

e) Análisis realizados por la Universidad de Cádiz.

VII.4 Discusión

VII.5 Bibliografía

VII.1 Resumen y objetivos

Este experimento es una parte de los ensayos realizados durante la ejecución del Proyecto **MugilDiet**, Convocatoria Pleamar, FEMP (2017/2424). Del mismo modo que los experimentos anteriores. El objetivo principal del mencionado proyecto era el diseño de dietas adecuadas para mugílidos.

En concreto este estudio se realizó en las instalaciones de la Universidad de Murcia, el objetivo principal fue evaluar la capacidad de ejemplares de liseta (*Chelon labrosus*) para asimilar materias primas con unos porcentajes bajos de proteína y bajo coste (principalmente las levaduras de desecho de la industria cervecera), así como su respuesta inmune bajo unas condiciones de salinidad diferentes. En este experimento además de someterlos a regímenes alimentarios menores a los tradicionales en comparación con los utilizados para otras especies carnívoras, los grupos experimentales se mantuvieron en condiciones de salinidad diferentes (0-1 ‰ y 36 ‰) durante la duración del experimento.

En este trabajo se utilizaron dos dietas fabricadas para el experimento y con idéntico nivel de nutrientes, con la diferencia entre ellas de los perfiles de ácidos grasos. Una dieta M con un perfil marino y la dieta T con un perfil vegetal (en la denominación terrestre), respectivamente B70M+ y B70T+. *Vide supra* el capítulo II, Materiales y métodos.

Esta evaluación, de manera similar a los anteriores experimentos se realizó mediante el estudio de los parámetros clásicos de crecimiento y del estado del sistema inmunitario durante una experiencia de dos meses.

Como objetivo secundario se estableció incrementar el conocimiento sobre la respuesta nutricional e inmune de los ejemplares de liseta frente a condiciones de salinidad diferentes, una salinidad equiparable al agua de mar (36 ‰, y una salinidad equiparable al agua dulce 0 - 1 ‰). El peso inicial de los ejemplares fue de $24,49 \pm 0,58$ g (n=160).

Los anteriores experimentos se habían realizado a una salinidad algo menor siendo la salinidad de trabajo usual 28 ‰

VII.2 Materiales y métodos

De manera resumida se recogen los materiales y métodos particulares del experimento realizado.

VII.2.1 Peces

Ciento sesenta ejemplares de *Chelon labrosus* de un lote original de 200 fueron aleatoriamente seleccionados para el experimento. Los peces con un peso inicial $24,49 \pm 0,58$ g (n=160) se obtuvieron del CIFP Marítimo Zaporito (San Fernando, Cádiz). Los peces fueron aleatoriamente distribuidos en ocho tanques iguales y aclimatados por dos semanas antes de comenzar el experimento, durante este periodo fueron alimentados con una dieta comercial para tilapia (Ti3, Skreeting, Burgos, España).

Durante el experimento se evaluaron dos dietas, por duplicado. El número de peces por tratamiento fue de 40 (n=40). Los tratamientos salinidad fueron FW (0 - 1 ‰) y MW (36 ‰)

VII.2.2 Dietas

Durante el experimento se utilizaron dos dietas experimentales: Dieta M: B70M+ (Biothesan, Granada, España); y Dieta T: B70T+ (Biothesan, Granada, España). Para información adicional sobre dichas dietas *vide supra* Capítulo II. Materiales y métodos. No se muestra la composición proximal o de materias primas exacta de estas dietas, pero es una composición igual a la dieta B70.

Las dietas se seleccionaron por diferentes motivos: Ambas dietas contenían un 20 % respectivamente de harina de pescado (proveniente de desechos de conserveras y procesado de pesquerías, de baja proteína 56 -58 % PB.), y su principal fuente de proteína son las levaduras de desecho, 62,5 % sobre peso húmedo. Los perfiles de grasas de ambas dietas fueron diferentes pero iguales en cantidad, mientras que la dieta M, contenía un 6,5 % de aceite de pescado de relativa baja calidad provenientes de desechos procesado de pesca y conserveras, la dieta T contenía un 6,5 % de aceite virgen de oliva extra. Siendo estas las principales fuentes de ácidos grasos (el aceite de pescado y el aceite de oliva virgen extra). El resto de ácidos grasos son los que aportan residualmente otras materias primas como la harina de pescado, etc.

En la Tabla 13 se recoge la composición resumida de los ácidos grasos de las dietas M (B70M+) y T (B70T+) en la que se puede comprobar la gran cantidad de aporte de ácidos grasos monoinsaturados de la dieta B70T+.

Tabla 13: Composición en ácidos grasos resumida

	Dieta A	Dieta B
	B70M+	B70T+
Total saturados	27,59	23,11
Total monoinsaturados	39,74	65,49
Total n-6 PUFA	22,18	5,15
20:5n-3 (EPA)	4,37	0,83
22:6n-3 (DHA)	13,42	3,22
Total n-3 PUFA	22,18	5,15
n-3/n-6	2,04	0,82

VII.2.3 Diseño experimental

Los peces fueron estabulados durante 60 días, de los que solo fueron alimentados 49. La tasa de alimentación fue de un 1,5 % de la biomasa inicial total de cada tanque, no se realizaron muestreos de peso intermedio, ni corrección de la tasa de alimentación entre el muestro de peso inicial y final (n=40). La tasa de alimentación real en función de los días que se alimentaron los peces fue de 1,22. Tasa muy inferior a la recomendada por ejemplo para tilapias alimentadas con dietas de baja proteína de esta talla y a la temperatura experimental (5 % aproximadamente). Los peces quedaron distribuidos aleatoriamente según los siguientes tratamientos: (FW M, FW T), (MW M, MW T), es decir cuatro tanques de agua dulce (FW), y cuatro de agua marina (MW), que se alimentaron con las diferentes dietas terrestre (T) y marina (M). Los tratamientos se realizaron por duplicado.

Después de ese periodo de los 20 peces que había en cada tanque se anestesiaron y se muestrearon aleatoriamente cinco ejemplares por tanque y tratamiento (n=10). Otros 5 peces se muestrearon para la toma de muestras por la Universidad de Cádiz. El resto en atención al principio de las 3Rs se recuperaron para otros trabajos. Se tomaron muestras de tejidos, sangre y moco, así como de riñón cefálico. Las muestras de suero y moco fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a - 80° C para su posterior tratamiento. Las muestras de riñón cefálico fueron procesadas y analizadas a la finalización del muestreo en el Servicio Universitario de Instrumentación Científica de la Universidad de Murcia para obtener los datos relativos a la inmunidad celular. El resto de muestras fueron analizadas en días posteriores para obtener los resultados de las actividades humorales siguiendo los métodos descritos con anterioridad en esta sección de la tesis. *Vide supra* Capítulo I, Materiales y métodos.

VII.2.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos han sido representados en las gráficas y tablas correspondientes como la media \pm el error estándar (SEM) para cada parámetro medido. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS 19.0. Para calcular la normalidad de los datos previamente se realizó la prueba Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza fue verificada usando la prueba de Levene. Para comparar las medias entre muestras se realizó la prueba T de Student, y para los no normales, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (dichos datos se transformaron previamente). Las diferencias significativas entre grupos o dietas se analizaron mediante Anova factorial (cuando el número de grupos o dietas lo permitía), o alternativamente se realizó la prueba T de Student. Las pruebas Anova conllevaron un análisis post-hoc de Tukey o Games-Howell. Principalmente estas son las pruebas estadísticas realizadas para determinar las diferencias significativas entre ellas, considerando las diferencias estadísticamente significativas al 95 % de nivel de confianza ($p \leq 0,05$) en todos los casos. Todas las medias se han realizado por triplicado.

VII.3 Resultados

Del crecimiento de los peces y de los resultados de las diferentes técnicas analíticas realizadas sobre las muestras biológicas debidamente conservadas se recogen aquellas que se consideran más interesantes en función de los resultados obtenidos y los objetivos del experimento. Los métodos relativos a dichas técnicas se recogen en el capítulo I, Materiales y métodos, *vide supra*.

a) Comportamiento, canibalismo y mortalidad

No se produjo ninguna mortalidad en los ejemplares sometidos a experimentación. Tampoco se produjeron episodios de canibalismo (inusuales en esta especie) aun siendo las tasas de alimentación deficitarias por mucho en cantidad y calidad, y los peces de talla pequeña (aproximadamente 24 g). Nunca se apreciaron visualmente heridas, erosiones de aletas, descamaciones, etc. producidas por episodios de agresividad.

Desde el punto de vista de esta investigación junto con el resto de experimentos realizados y resultados presentados en los capítulos anteriores, resulta interesante resaltar que aun siendo la alimentación suministrada teóricamente deficiente en cantidad y calidad de las dietas MN y mN no se han producido este tipo de episodios. Ni anteriormente en los ejemplares de dorada (*S. aurata*) con los que era previsible que ocurrieran este tipo de comportamientos, ni para los ejemplares de liseta (*C. labrosus*) en los que no se esperaba que sucediera.

En este experimento en concreto no se considera que los peces estuvieran saciados al menos al punto de lograr el crecimiento, ya que alguno de los grupos incluso decrece. Por lo que es de agradecer que todos los ejemplares terminaran el experimento y no se produjeran bajas debido al canibalismo. Factor que reiteramos es poco valorado en los mugílidos como especie de cultivo. Si en lugar de ser ejemplares de liseta hubieran sido de dorada o lubina probablemente el experimento habría tenido tal número de bajas diarias que no se hubiera podido finalizar.

a) Crecimiento

A partir de los datos obtenidos durante los muestreos biométricos los días 0, y 60 de peso (P), ($g \pm 0,01$) y la ración diaria proporcionada a cada grupo experimental se pudieron calcular los parámetros relativos al crecimiento de los sujetos experimentales y el aprovechamiento de la alimentación proporcionada, Tabla 14.

Tabla 14: Índices de crecimiento y aprovechamiento del alimento durante el periodo experimental

Dieta	Salinidad	ICA	ICAC	% crecimiento*	IP**	TEP	FE	TCE
A (B70M+)	0-1 ‰	3,24 \pm 0,73	2,01	23,85	199,69	1,13 \pm 0,25	0,32 \pm 0,07	0,35 \pm 0,07
B (B70T+)	0-1 ‰	4,96 \pm 0,91	3,07	15,31	202,44	0,72 \pm 0,13	0,20 \pm 0,03	0,23 \pm 0,04
A (B70M+)	36 ‰	-13,37 \pm 0,34	-8,28	-5,49	225,96	-0,26 \pm 0,00	-0,07 \pm 0,01	-0,09 \pm 0,01
B (B70T+)	36 ‰	16,13 \pm 3,28	9,99	4,75	195,42	0,22 \pm 0,04	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02

Crecimiento e índices de crecimiento de los tratamientos Dieta A, B. Valores promedio \pm error estándar de la media.

No hay diferencias significativas entre los parámetros analizados ($P < 0,05$)

* % de crecimiento desde la talla inicial, no evaluado estadísticamente ** Ingesta de proteína

ICA= Índice de conversión del alimento, TEP= Tasa de eficiencia de la proteína

ICAC= Índice de conversión de alimento corregido en humedad. En este caso no aplica por tener una humedad estándar del 8%

Dada la tasa de alimentación reducida (1,5 % peso de la biomasa por tanque/ día, y un 1,225 % ajustada a los días realmente alimentados) el crecimiento de los peces es el esperado. Para las lisetas mantenidas en agua dulce el crecimiento es reducido, pero no inexistente, y algo menor para los peces alimentados con la dieta T (B70T+) con el perfil de ácidos grasos principalmente vegetal. Por el contrario, el crecimiento en los peces sometidos a un estrés osmótico por salinidad relativo (ya que la salinidad es igual a las condiciones del Mar Mediterráneo) es inferior al esperado. Dichos grupos no solo no crecen, ya que en el caso de los peces alimentados con la dieta M (B70 M+) incluso decrecen en un pequeño porcentaje, - 5,49 % respecto del peso inicial (desde el inicio del experimento, total 60 días) y un -0,09 % diario por lo que podríamos considerar que este grupo ha sido alimentado al límite de sus necesidades de mantenimiento. Sin que podamos descartar de manera absoluta otras causas que hayan influido en su crecimiento, aunque los peces aparentemente gozaban de salud, no tuvieron heridas, descamaciones, decoloraciones, ni externamente se pudo apreciar ningún signo patológico).

Tampoco se apreció rechazo de la dieta (en ninguno de los experimentos realizados, y en todos se puede descartar ese motivo), desperdicio de alimento, o comportamientos asociados a estrés, saltos de los tanques, etc.

Las tasas de eficiencia proteica (TEP), así como la eficiencia del alimento (FE) o la tasa de crecimiento logarítmica (TCE) también son menores de lo esperado. Lo cual puede ser debido a que para esa talla los ejemplares de *C. labrosus* aún no han migrado a mar abierto. Si aplicamos el principio de parsimonia, la explicación más sencilla y más probable es que ni las dietas han cubierto las necesidades energéticas para una salinidad del 36 ‰, y puede que además el tamaño de los ejemplares fuera demasiado pequeño para esas condiciones de salinidad.

No se muestran los resultados estadísticos por ser irrelevantes, dado que son más que obvias las diferencias entre unos grupos y otros, pero con la «virtud» de compensarse las medias entre las diferentes dietas, además de no significativas pueden conducir a un error en su análisis.

b) Parámetros inmunitarios

Una vez comprobado que las dietas no cubren los requerimientos nutricionales de la especie para esta salinidad, etapa de desarrollo, salinidad (36 ‰) y temperatura queda por comprobar si independientemente de eso si ha cubierto las necesidades del sistema inmunitario a través de las actividades humorales y celulares analizadas (que son similares a las del resto de los experimentos). Siendo este punto relevante para esta investigación ya que los animales mantenidos en la salinidad de 36 ‰ se puede considerar que independientemente de la dieta con la que fueron alimentados estas dietas solo cubrían las necesidades de mantenimiento energético.

En los siguientes apartados se muestran los resultados de las actividades evaluadas de la inmunidad humoral y celular que fueron analizadas en los ejemplares sujetos a experimentación. Casi todas ellas muestran significaciones estadísticas ($P < 0,05$), tanto entre grupos, dietas o condiciones de salinidad.

Lamentablemente no se pudo realizar el reto bacteriano con *T. soleae* que estaba previsto al finalizar el periodo de experimentación.

c.1 Parámetros de la inmunidad humoral

En los siguientes apartados se muestran las actividades de la inmunidad humoral que fueron analizadas en los ejemplares sujetos a experimentación.

b.1) Actividad enzimática del suero

c.1.1.a) Actividad peroxidasa del suero

En la Figura 59 se muestran los niveles de peroxidasa del suero después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (Dietas x Salinidad). No existen ni muestran resultados estadísticamente significativos entre las dietas ($P < 0,05$).

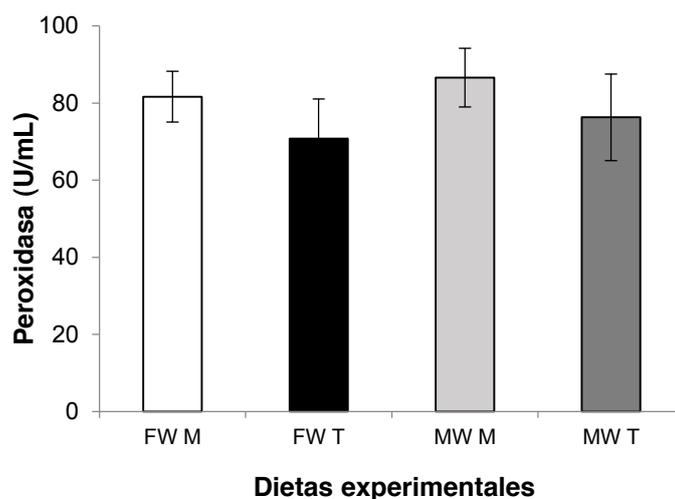


Figura 59. Niveles totales de peroxidasa en suero después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (dieta y salinidad). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ($n=10$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta); * denota diferencias significativas entre las dietas a una misma salinidad; Y los *corchetes diferencias entre las diferentes salinidades. ($P < 0,05$).

c.1.1.b) Actividad proteasa del suero

En la Figura 60 se muestran los niveles de proteasa del suero después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (Dietas x Salinidad). No existen ni muestran resultados estadísticamente significativos entre las dietas, ni en las dietas por las condiciones de salinidad, y como era de esperar si por la salinidad ya que estos peces (MW) mantenidos a 36 ppm son los que peor condición inmunitaria en relación con la nutricional tienen, siendo los niveles de actividad significativamente inferiores, aunque cercanos en valor. ($P < 0,05$).

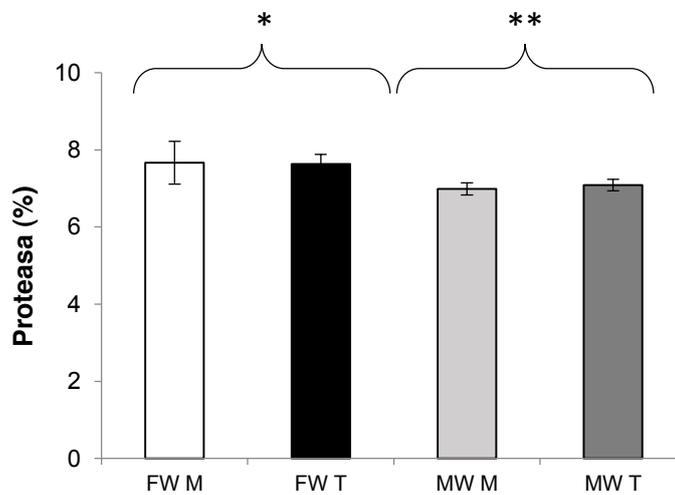


Figura 60. Niveles totales de proteasa en suero después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (dieta y salinidad). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ($n=10$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta); * denota diferencias significativas entre las dietas a una misma salinidad; Y los *corchetes diferencias entre las diferentes salinidades. ($P < 0,05$).

c.1.1.c) Antiproteasa del suero

No se detectó la actividad antiproteasa en ninguno de los grupos.

c.1.1.d) Actividad lisozima del suero

En la Figura 61 se muestran los niveles de lisozima del suero ($\mu\text{g/mL}$ equivalente de actividad HEWL) después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (Dietas x Salinidad). No existen ni muestran resultados estadísticamente significativos entre las dietas ($P < 0,05$).

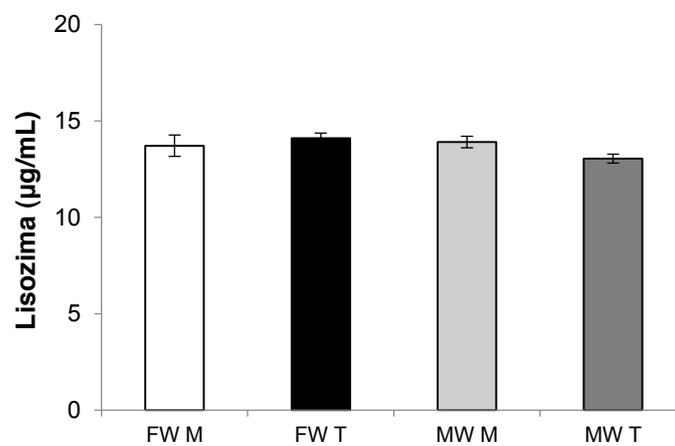


Figura 61. Niveles totales de lisozima en suero después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (dieta y salinidad). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ($n=10$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta); * denota diferencias significativas entre las dietas a una misma salinidad; Y los *corchetes diferencias entre las diferentes salinidades. ($P < 0,05$).

c.1.2) Actividad enzimática del moco de la piel

De las actividades enzimáticas analizadas del moco de la piel de los peces, se analizaron todas las actividades propuestas en el diseño experimental. De manera similar a como se ha hecho en el resto de experimentos se muestran de manera ordenada. Siendo mínimas las diferencias encontradas entre los diferentes tratamientos (Dietas x Salinidad) estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

c.1.2.a) Actividad peroxidasa del moco de la piel

En la Figura 62 se muestran los niveles de peroxidasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (Dietas x Salinidad). Existen diferencias estadísticamente significativas en casi todos los niveles, entre las dietas (a, b, y bc) mostrando unos niveles más altos los peces que peor resultado de crecimiento han tenido ($P < 0,05$). Y también existen diferencias entre los animales mantenidos en diferentes condiciones de salinidad (corchetes con asteriscos). No existen diferencias entre las diferentes dietas y mismas condiciones. Así para una misma salinidad el factor dieta no es relevante.

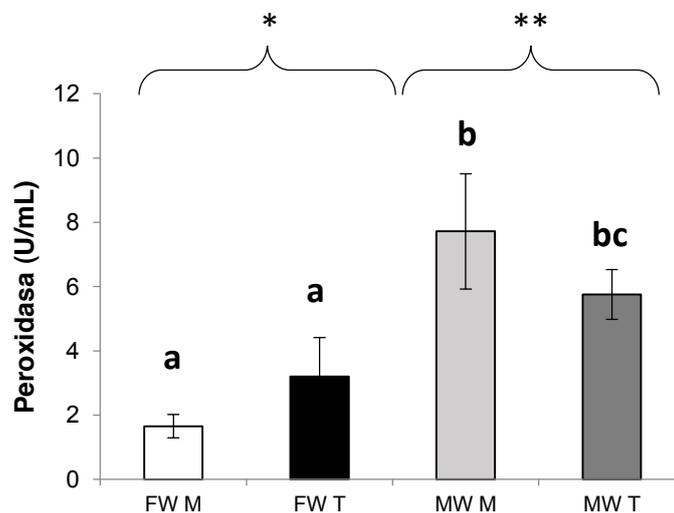


Figura 62. Niveles totales de peroxidasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (dieta y salinidad). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ($n=10$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta); * denota diferencias significativas entre las dietas y a una misma salinidad; Y los *corchetes diferencias entre las diferentes salinidades. ($P < 0,05$).

c.1.2.b) Actividad proteasa del moco de la piel

En la Figura 63 se muestran los niveles de peroxidasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (Dietas x Salinidad). ($P < 0,05$). Existen diferencias estadísticamente significativas en el factor salinidad, y los peces mantenidos en la condición marina presentan unos niveles más altos de actividad proteasa en el moco de la piel, igual que sucedía con la actividad peroxidasa. El factor dieta frente a las diferentes salinidades también es estadísticamente significativo ya que los niveles de actividad son muy diferentes (a y b) pero para una misma salinidad el factor dieta no es determinante de diferencias significativas.

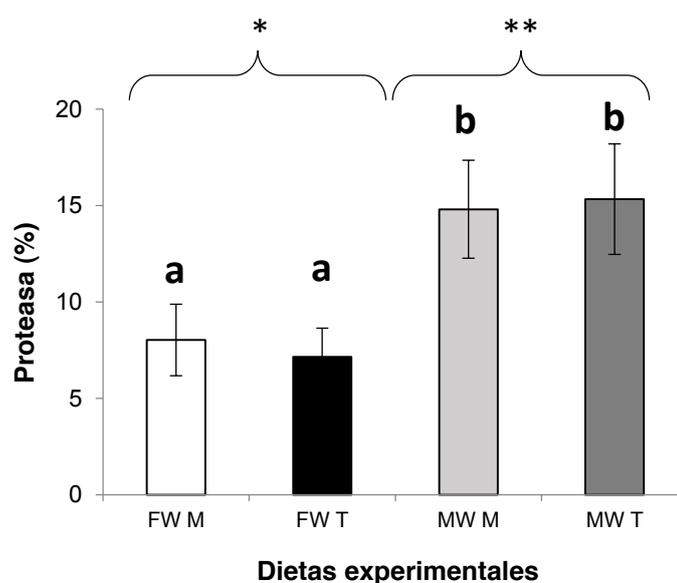


Figura 63. Niveles totales de proteasa del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (dieta y salinidad). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ($n=10$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta); * denota diferencias significativas entre las dietas y a una misma salinidad; Y los *corchetes diferencias entre las diferentes salinidades. ($P < 0,05$).

c.1.2.c) Actividad antiproteasa del moco de la piel

No se detectó la actividad antiproteasa, al igual que sucedió en suero.

c.1.2.d) Actividad lisozima del moco de la piel

En la Figura 64 se muestran los niveles de lisozima del moco de la piel ($\mu\text{g/mL}$ equivalente de actividad HEWL) después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (Dietas x Salinidad). A diferencia de la actividad lisozima en el suero existen diferencias estadísticamente significativas a todos los niveles. ($P < 0,05$). Los niveles de la actividad lisozima para los animales alimentados con la dieta A o Marina, en la condición de agua dulce son relativamente más bajos que los del resto de las dietas (a, y b). Para una misma condición de salinidad (FW o MW) los niveles de actividad en función de la dieta (M o T) también son diferentes estadísticamente. Y la condición salinidad también arroja diferencias. De nuevo los peces con peor estado nutricional arrojan valores más altos de actividad. Y salvo los peces alimentados con la dieta marina (M) y en la condición de agua dulce (FW) los demás reiteramos tienen unos niveles más altos de actividad lisozima.

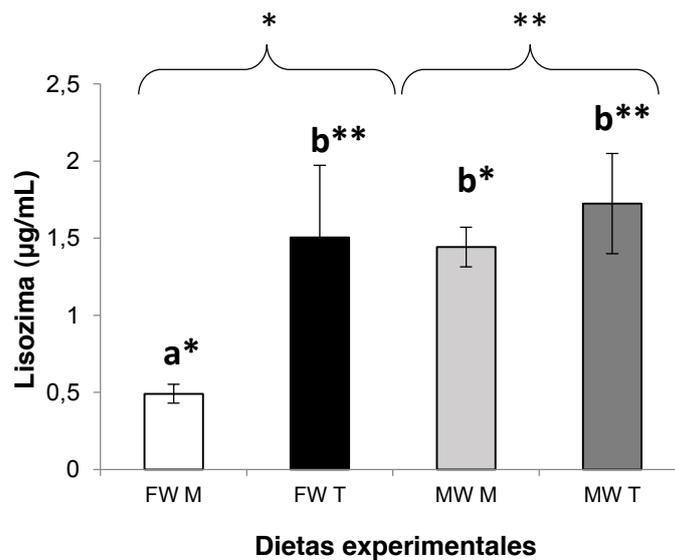


Figura 64. Niveles totales de lisozima del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (dieta y salinidad). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ($n=10$). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta); * denota diferencias significativas entre las dietas y a una misma salinidad; Y los *corchetes diferencias entre las diferentes salinidades. ($P < 0,05$).

Los niveles de lisozima del moco de la piel de los *C. labrosus* del capítulo V son similares en cantidad a los que presenta los animales alimentados con la dieta Marina en agua dulce (entre 0,5 y 1 $\mu\text{g/mL}$ equivalente de actividad HEWL). Peces en principio que no tuvieron ningún tipo de anomalía en el crecimiento.

c.1.2.e) Cuantificación de proteínas en el moco de la piel

En la Figura 65 se muestran los niveles de proteína del moco de la piel (mg/mL) después de un periodo de alimentación de 60 días y para los diferentes tratamientos (Dietas x Salinidad). No existen, ni se muestran resultados estadísticamente significativos entre las dietas salinidades, por el contrario, a las demás actividades analizadas si existen diferencias entre las dietas (a, ab, c), aunque los valores de proteína están dentro de lo que suele ser habitual, y tan solo quizás un poco más altos en los peces con peor condición nutricional los alimentados con la dieta M en condiciones de agua de marinas (MW) ($P < 0,05$). Sin ser en ningún momento significativas estadísticamente, y solo son diferentes estos valores con los de la dieta terrestre y condición marina (c).

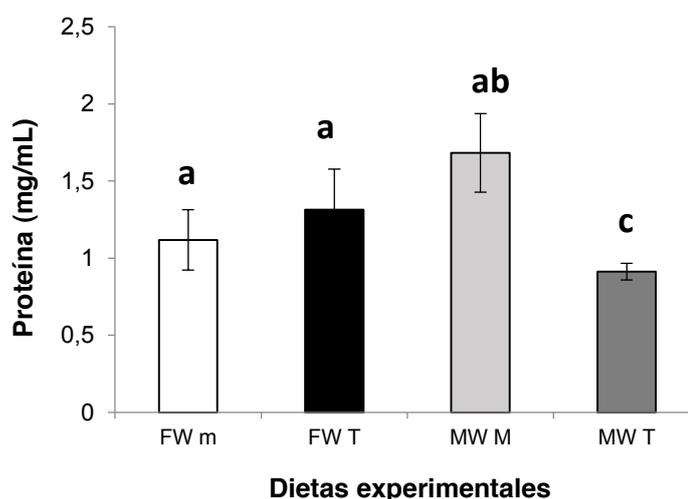


Figura 65. Niveles totales de proteína del moco de la piel después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (dieta y salinidad). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta); * denota diferencias significativas entre las dietas y a una misma salinidad; Y los *corchetes diferencias entre las diferentes salinidades. ($P < 0,05$).

d) Parámetros de la inmunidad celular

En los siguientes apartados se muestran las actividades de la inmunidad celular que fueron analizadas en los ejemplares sujetos a experimentación. En general, en la evaluación de la inmunidad celular se repite el patrón que ya hemos puesto de manifiesto durante los apartados anteriores sobre la inmunidad humoral. Respecto de la fagocitosis cabe destacar que el grupo con peor crecimiento denota una peor respuesta tanto a la capacidad como frente a la habilidad para fagocitar las levaduras del test (MW M). Del mismo modo se vuelve a mostrar las diferencias entre las salinidades. Y en la capacidad es aún más patente esa diferencia entre ambas dietas (T y M) significándose estadísticamente. No existen diferencias entre las dietas.

Lamentablemente los datos de la actividad peroxidasa de los leucocitos de riñón cefálico y de la explosión respiratoria de los leucocitos de riñón cefálico por un problema con el almacenamiento de datos fortuito y ajeno a la voluntad de los investigadores no están disponibles.

d.1 Actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico

La habilidad fagocítica se define como el porcentaje de células de levaduras marcadas (con FITC) con una o más bacterias ingeridas dentro de la población celular fagocítica, mientras que la capacidad fagocítica se define como la intensidad media de fluorescencia. En la Figura 66 se muestran los valores de la capacidad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico, así como en la Figura 67, los valores de la habilidad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico.

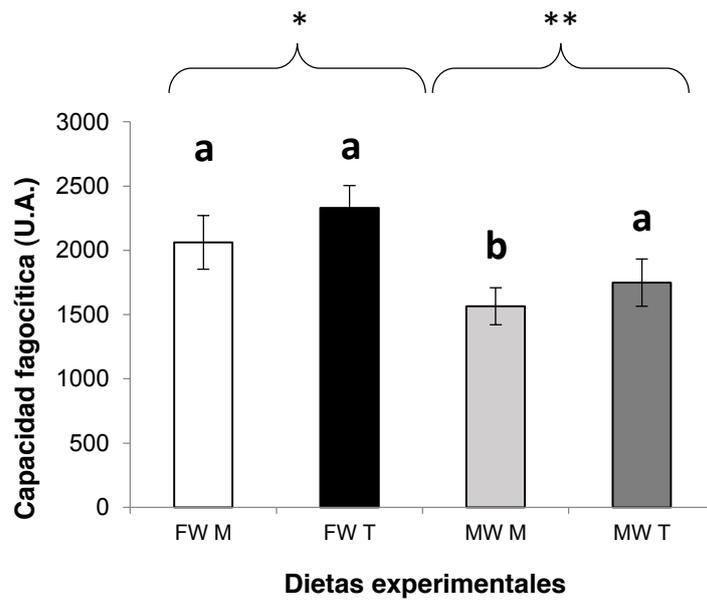


Figura 66. Niveles totales de capacidad fagocítica en leucocitos de riñón cefálico después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (dieta y salinidad). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta); * denota diferencias significativas entre las dietas y a una misma salinidad; Y los *corchetes diferencias entre las diferentes salinidades. (P <0,05).

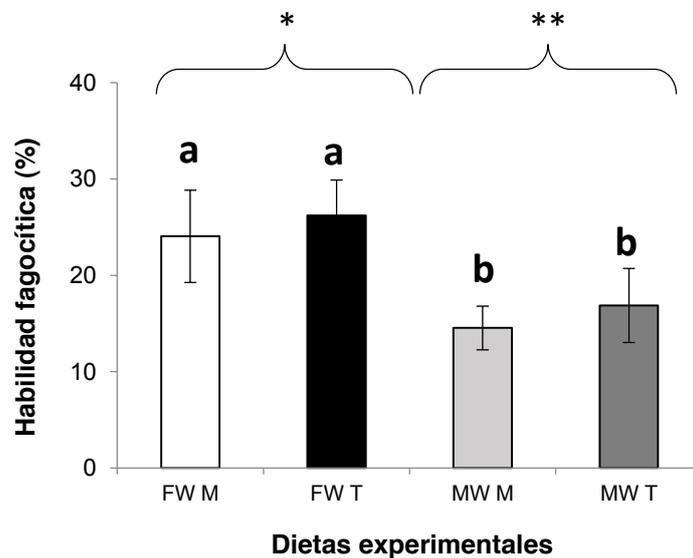


Figura 67. Niveles totales de habilidad fagocítica en leucocitos de riñón cefálico después de un periodo de alimentación de 60 días para los diferentes tratamientos (dieta y salinidad). Los datos representan el promedio \pm el error estándar. (n=10). Diferentes letras denotan diferencias significativas para el tratamiento (dieta); * denota diferencias significativas entre las dietas y a una misma salinidad; Y los *corchetes diferencias entre las diferentes salinidades. (P <0,05).

e). Análisis realizado en Universidad de Cádiz.

Gracias al proyecto **MugilDiet**, Convocatoria Pleamar, FEMP (2017/2424), investigadores de la Universidad de Cádiz se pudieron desplazar a nuestras instalaciones y realizar un muestreo sobre parte de los peces sobrantes de este experimento, analizando entre otras muestras, el hígado y el plasma. Tabla 15.

Tabla 15. Análisis realizado en la Universidad de Cádiz sobre muestras de hígado y plasma.

	<i>Salinidad (ppm)</i>	<i>1 ppm</i>		<i>36 ppm</i>	
	<i>Tipo de dieta</i>	<i>Dieta marina</i>	<i>Dieta terrestre</i>	<i>Dieta marina</i>	<i>Dieta terrestre</i>
PLASMA	<i>Osmolalidad (mOsm kg⁻¹)</i>	323,7 ± 11,7 ^{ab}	304,3 ± 4,139 ^a	338,8 ± 5,924 ^b	329,3 ± 3,122 ^{ab}
	Glucosa (mM)	3,248 ± 0,1498	2,336 ± 0,3307	2,455 ± 0,2179	2,703 ± 0,2623
	Lactato (mM)	2,228 ± 0,6694	2,020 ± 0,2516	1,789 ± 0,2737	1,648 ± 0,1474
	Triglicéridos (mM)	1,227 ± 0,3931	2,090 ± 0,3762	1,345 ± 0,1099	1,784 ± 0,4666
	Proteínas totales (mg mL ⁻¹)	26,53 ± 2,374	20,59 ± 2,610	15,08 ± 2,026	15,29 ± 3,616
	<i>Salinidad (ppm)</i>		<i>1 ppm</i>		<i>36 ppm</i>
HÍGADO	<i>Tipo de dieta</i>	<i>Dieta marina</i>	<i>Dieta terrestre</i>	<i>Dieta marina</i>	<i>Dieta terrestre</i>
	Glucosa libre (mg glc g hígado ⁻¹)	3,125 ± 0,1645	3,295 ± 0,1702	3,466 ± 0,1988	2,714 ± 0,2033 [*]
	Glucógeno (mg glc g hígado ⁻¹)	9,369 ± 0,9180	11,16 ± 1,192	8,651 ± 1,382	8,911 ± 1,022
	Triglicéridos (mM)	1,227 ± 0,3931	2,090 ± 0,3762	1,345 ± 0,1099	1,784 ± 0,4666

Letras minúsculas indican diferencias entre grupos pertenecientes a diferente salinidad. Asteriscos (*) indican diferencias entre dietas para una misma salinidad. ANOVA de dos factores, p < 0,05.

VII.4 Discusión

Por un lado, es interesante comprobar la resistencia de los mugílidos a las bajas tasas de alimentación en cantidad y calidad, y aun así mostrar la capacidad para crecer (como sucede con los ejemplares mantenidos en agua dulce) que arrojan independientemente de la dieta tasas de eficiencia en la conversión del alimento razonables. Por otro lado, es sabido la presión que supone para los organismos las diferencias osmóticas en el medio, y la realización de este experimento ha llevado esa capacidad de crecimiento al límite ya que los peces mantenidos en la condición salina han rozado en todo momento la pérdida de peso o el crecimiento mínimo, independientemente de la dieta que tampoco es un factor determinante. Haber llevado a los peces a estos extremos implica que indirectamente se puede calcular las necesidades de energía de mantenimiento para la condición marina. Esto hubiera sido imposible si las dietas hubieran tenido (a iguales contenidos de proteína y de grasas) un nivel mucho más alto de ELN, que también aporta energía.

Estos aspectos se han ido discutiendo en general a lo largo del texto, y así las diferencias de energía entre las dietas formuladas para esta experimentación y la dieta Ti3 (que duplica su contenido energético) son abismales en energía bruta, y por tanto en energía disponible para el crecimiento. Lo interesante en todo momento es que la sustitución de ELN por humedad en la formulación de los piensos permite medir estos mínimos sin tener el inconveniente de haber modificado MN, mN, etc. como se discutió en el capítulo III.

Respecto a la inmunidad celular y humoral de la liseta, resaltar que sin duda los peces con peor condición nutricional tienen una peor respuesta inmunitaria, y mientras las actividades de la inmunidad humoral están activadas, la inmunidad celular y tanto la capacidad como la habilidad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico de la liseta se encuentra deprimida en los peces desnutridos. Al igual que sucede con una infección como hemos visto en los capítulos IV y VI.

En los niveles de la actividad proteasa del suero no existen ni muestran resultados estadísticamente significativos entre los diferentes peces alimentados con las diferentes dietas, ni en las dietas por las condiciones de salinidad, y como era de esperar si por la salinidad ya que estos peces (MW) mantenidos a 36 ppm son los que peor condición

inmunitaria en relación con la nutricional deberían tener, siendo los niveles de actividad estadísticamente significativos e inferiores, aunque cercanos en valor.

En referencia a los valores presentados de proteína total en el moco, Figura 65 comentar que los valores presentados en el Capítulo 4 para dorada (*S. aurata*) son algo superiores (entre 1,2 y 1,4 mg/mL). En experimentos anteriores para *C. labrosus* (Vilchez-Gomez, 2017). Los valores presentados se encontraban en un rango aproximadamente entre 1,4 y 1,8 mg/mL.

Respecto de los análisis realizados por la Universidad de Cádiz, Tabla 15, las diferencias encontradas entre ambas dietas se corresponden a un cambio en la osmolaridad del plasma, siendo el menor en el tratamiento de agua dulce y dieta terrestre (FW T) aunque estos valores se encuentran dentro de una normalidad. La otra diferencia estadística es debida a un menor nivel de glucosa libre en el hígado de los peces del grupo mantenido en condiciones de salinidad y alimentados con la dieta de perfil terrestre (MW T). Al menos resulta interesante las pocas diferencias encontradas gracias a estas técnicas teniendo en cuenta el nivel de decrecimiento de los peces mantenidos a la salinidad a 36 ‰, para ambas dietas M y T

Tampoco se trata de hacer una comparación exhaustiva con otras especies y en el mismo sentido que hemos comentado en el capítulo anterior trabajar con especies nuevas desde el punto de vista de la inmunología es un reto que no permite extraer conclusiones excesivamente generales de tan solo cuatro experimentos.

VII.5 Bibliografía

Vilchez-Gomez, L. (2017). *Evaluación de dietas en mugílidos. Trabajo fin de Máster.*

[Master Thesis Máster Universitario en Gestión de Recursos Pesqueros y Acuicultura. Facultad de Biología.]. Universidad de Murcia.

Sección tercera

Capítulo VIII. Evaluación bioeconomica de la sustitución de las harinas de pescado por otras materias primas alternativas, y de las dietas de la investigación



Cyprinus carpio carpio (Linnaeus, 1758)

(latín tardío karpa, y este a su vez del gótico carpa) (Diccionario Real Academia de la Lengua 23 ed)
Río Guadalquivir (Coria del Río) - 2008 (Foto: A. M. Arias)
Derechos cedidos por M. Arias, www.ictioterm.es

Sección tercera:

Evaluación económica de la valorización de subproductos de la industria cervecera en piensos para acuicultura

Capítulo VIII. Evaluación bioeconómica de la sustitución de las harinas de pescado por otras materias primas alternativas

VIII.1 Objetivos

VIII.2 Las materias primas utilizadas en este trabajo

VIII.2.1 La harina de pescado

VIII.2.2 La calidad de la harina de pescado en los piensos

VIII.3 Las dietas y su conversión en biomasa de manera eficiente

VIII.4 La obsesión de la industria ganadera con el Factor de Conversión

VIII.5 La necesaria comparación de los datos biológicos obtenidos en este trabajo con otros estudios

VIII.6 Los precios de los piensos para la acuicultura

VIII.7 Integración con los datos de producción con los precios de los piensos. Análisis de los costes de la alimentación España – Egipto para la producción piscícola de diferentes especies. Evaluado en dos escenarios: pre-COVID19 y guerra de Ucrania, y actual (a 8/2022)

VII.5 Bibliografía

VIII.1 Objetivos

El objetivo de este capítulo es evaluar el problema de la sustitución de las harinas de pescado en dietas para la acuicultura desde una perspectiva económica y biológica.

Es difícil valorar la sustitución de materias primas en principio menos sostenibles — cómo las harinas y aceites de pescado— por otras que en principio se presuponen más sostenibles sin tener en cuenta las limitaciones que técnicamente tanto los peces, como la densa composición de los piensos para ganadería nos imponen. Así en el capítulo III, se ha puesto de manifiesto la dificultad de trabajar con peces en los que es difícil individualizar la ingesta, o con piensos secos extruidos que al realizar una modificación de su composición se altera o bien su contenido en MN o mN, o bien su contenido energético. Por lo que puede resultar sin intencionalidad alguna un sesgo en la investigación difícilmente evitable.

Si recapitulamos de manera rápida por los experimentos realizados, el factor dieta es quizás el que menos ha influido en el crecimiento de los peces. Y sin duda la mayor diferencia se ha producido en el capítulo VI, Fig. 47, con el mújol «glotón», que en cierto modo nos recuerda al mújol «enorme» de Séneca (Epis., XCV). Mújol del que recoge su subasta por cinco mil sestercios, de peso unas cuatro libras y media romanas (una libra romana eran 273 g). Tamaño que en la naturaleza un mújol necesita al menos dos años para alcanzar y en cultivo, nuestro mújol enorme tan solo ha necesitado dos meses para alcanzar la mitad de su peso comercial para el gusto de los romanos. También nos recuerda esta anécdota que el precio va ligado al peso, pero sobre todo a la talla.

Y es necesario centrar este capítulo a su objetivo, y no solo en los aspectos transversales a la economía y a una necesaria visión global del trabajo. Ya que si las grandes salmoneras no han conseguido reducir la dispersión en sus cultivos (Fig. 23) con el coste económico que les conlleva difícilmente nosotros a nuestra escala podremos aportar soluciones, y sirva de crítica a los estudios sobre el crecimiento (incluido este) ya que trabajamos principalmente con pesos medios.

VIII.2 Las materias primas utilizadas en este trabajo

Es innegable que el primer factor económico a evaluar en las dietas son las materias primas que se incorporan a ellas, mucho se ha escrito sobre la evolución de los precios y la escasez de la harina de pescado y sobre los aceites de pescado (por ser un bien más escaso y menos sustituible si no se quiere reducir la calidad del producto final y la ratio $\omega-3/\omega-6$).

Evidentemente el factor precio y demanda es el más estudiado en general por la economía, pero olvidamos que el factor calidad está ligado de manera razonable a su precio, y son pocos los trabajos que recogen ese factor precio respecto de la calidad. Y se usan precios sobre calidades medias de la harina de pescado. Y aunque mediante comunicación personal el Ministerio de la producción de Perú me ha facilitado datos sobre la producción de tres tipos de harina: Tradicional, Prime y Súper Prime, aún estoy pendiente de que me aclaren las diferencias entre dichos tipos de harina, así como sus precios.

VIII.2.1 La harina de pescado

Respecto de la harina y aceite de pescado utilizada en esta tesis provienen de subproductos de la industria conservera y transformadora del mar Cantábrico. Estas materias primas fueron adquiridas a Pescave, S.A. Si bien, siendo un producto de cercanía y calidad el perfil nutricional de esta harina difiere a la baja en proteína de las harinas de alta calidad utilizadas normalmente en otros estudios. Siendo su contenido en proteína de un 58 % frente a otras reiteramos de mayor calidad que su contenido proteico supera el 70 %.

El uso de este tipo de harinas ya supone tres hitos en la formulación de las dietas: 1) Dota de una nueva vida a un subproducto/residuo; 2) Reduce la dependencia de la industria acuícola de las pesquerías pelágicas; y 3) Disminuye con referencia a un mismo peso de inclusión frente a otras harinas de pescado LT o Prime en las dietas la cantidad de proteína que aporta a la dieta. Aspecto importante ya que por ejemplo para una inclusión en peso de 200 g como las dietas de esta tesis, el aporte de proteína de alta calidad varía en casi un tercio a favor de las que no hemos utilizado. También deberíamos tener en cuenta que los peces al igual que otros animales no son demandantes de proteína, sino de aminoácidos, pero trabajar a este nivel experimental no era posible.

Por un lado, se descartaron de partida otras opciones como era el uso de hidrolizados de pescado provenientes también de descartes de la pesca, solubles, etc. por ser estos son más limitados en cuanto cantidades disponibles en el mercado global. A nuestro entender, la disponibilidad anual en el mercado de este tipo de materias primas no se acerca a la gran cantidad de materia prima que se necesitaría para poner una formulación comercial en el mercado y para cubrir la demanda del sector (cientos o miles de toneladas). Hay que tener en cuenta que tan solo en España la producción de piensos para acuicultura ronda las 180.000 toneladas anuales, por lo que a una hipotética inclusión de una materia prima al 50 %, tan solo para el mercado local harían falta algo más de 90.000 toneladas (CESFAC, 2022), aspecto esencial de la producción de piensos que debe tenerse en cuenta. O que el salmón que consume el 10 % de la producción mundial de harinas de pescado necesitaría incrementar esta cantidad anualmente en 126.000 t de harina y en 18.000 t de aceite de pescado. Y cuando sus necesidades son en proteína, sería mucho más razonable trabajar ese incremento de demanda también en proteína dada reiteramos la variabilidad de porcentajes.

También se descartaron las harinas de krill, de calamar, etc. por su alto precio, escasa disponibilidad en cantidad para ser consideradas una materia prima de base de los piensos compuestos. También se descartaron, y sobre todo las harinas de krill antártico (*Euphausia superba*) y del *Calanus finmarchicus* ártico por considerarlas directamente poco sostenibles, ya que su uso aumentaría la presión de las pesquerías industriales sobre la cadena trófica marina en dos espacios de alto valor ambiental que creemos deben ser preservados de la industria extractiva. Y reiteramos, las cantidades actualmente disponibles en el mercado además no serían suficientes para poder ser considerados una materia prima base (de inclusión a más de un 20 % en las dietas) sin aumentar de manera insostenible la cuota de sus pesquerías.

No fue posible conseguir en su momento para realizar otro tipo de dietas y comprobar estas diferencias harina de pescado de alta calidad o LT, o NorgeLT, lo cual reiteramos supuso una limitación —pero no un problema—. Y aunque hubiera estado bien tener diferentes opciones, si se hubiera introducido esta harina de alta calidad en las dietas las hubiera alejado del objetivo de formular unas dietas más sostenibles al utilizar directamente recursos pesqueros y no subproductos. Si hubiera sido interesante reiteramos poder comparar estas harinas LT frente a las incluidas de menor cantidad proteica, y frente a los piensos comerciales, pero tampoco las instalaciones en las que se ha desarrollado este trabajo permiten realizar experimentaciones con un número mayor de dietas.

VIII.2.2 La calidad de la harina de pescado en los piensos

La diferencia en la calidad de las harinas de pescado es un factor que no se tiene normalmente en cuenta a la hora de formular dietas experimentales. Lo habitual es introducir en su formulación harina de la máxima calidad posible, como «patrón oro» de la industria en las formulaciones experimentales — LT o NorgeLT— con más del 70 % de proteína y menos del 12 % de cenizas.

Así, cuando en un trabajo científico, proyecto, u objetivo de sostenibilidad para el sector se insta la sustitución de la harina de pescado por otras materias primas más sostenibles, implícitamente el trabajo se estará refiriendo a este tipo harinas premium de alta calidad y más de un 70 % de proteína. El principal motivo de utilizar este tipo de harinas premium, o LT es equipar estas formulaciones experimentales a las formulaciones industriales que usan en la medida de lo disponible en el mercado harinas de alta calidad. Estas harinas se han convertido en el estándar o «patrón oro» de la industria acuícola por su alto contenido en proteína (> 70%), excelente perfil de aminoácidos y digestibilidad cercana al 90 % testada in vivo, como lo reconoce en su página web la IFFO u «Organización de Ingredientes Marinos», u organización de comercio internacional que representa a más del 50 % de la industria productora de ingredientes marinos (IFFO The Marine Ingredients Organisation, 2022).

La composición de los diversos tipos de harina tanto para las harinas de alta calidad, como de baja se puede comparar en diversas fuentes, bien en publicaciones científicas (Oliva-Teles et al., 2022), o en publicaciones de la industria. Es interesante comprobar la gran variabilidad posible de esta materia prima en diferentes páginas web y bases de datos abiertas (enlaces en la bibliografía a las diversas fuentes): La Organización de Ingredientes Marinos (IFFO), (IFFO The Marine Ingredients Organisation, 2022); en las tablas de ingredientes de la Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA), (Fundación Española Para el Desarrollo de la Nutrición Animal, 2022); o en las tablas disponibles en Feedipedia, (Feedipedia - Animal Feed Resources Information System - INRAE CIRAD AFZ and FAO, 2022a, 2022b).

Recientemente el reemplazo de las harinas y aceites de pescado por otras materias primas ha sido revisado por el profesor Oliva-Teles, (Oliva-Teles et al., 2015, 2022) coincidiendo plenamente con las afirmaciones realizadas en dicho trabajo sobre la calidad de las harinas de pescado, por lo que podemos afirmar que i) la harina de pescado no es una materia prima homogénea, por lo que la calidad debe ser un factor determinante cuando se considera su reemplazo con ingredientes alternativos. Y ii) su calidad depende del pescado de origen que se use y del proceso de producción lo cual resulta determinante del producto final (Hua et al., 2019).

Esta diferencia de calidad entre unas harinas de pescado y otras de mayor calidad, premium, estándar o procesadas de subproductos presentan en su composición varias diferencias de importancia entre sí, por un lado, en el contenido de proteína y por otro lado en el contenido de cenizas del producto final. Así las harinas de alta calidad contienen más de un 75% de proteína; entre un 8 y un 12 % de lípidos; y menos 12% de cenizas, frente a las de baja calidad realizadas con subproductos de la industria conservera que contienen un 50-55 % proteína y entre 20-30 % de cenizas (Oliva-Teles et al., 2022).

La harina utilizada en las dietas realizadas para esta experimentación se compró a Hijos de Emilio Ramírez, S.A (Pescave) (Cantabria, España) y tiene un valor de proteína de aproximado dependiendo de lote de fabricación de un 57-60 %, grasa bruta un 12 % aproximado, humedad un 8 % aproximado y entre un 21-23 % de cenizas. Tiene una fecha de consumo preferente de nueve meses y a petición del cliente se le pueden incluir antioxidantes autorizados por la Unión Europea. En este caso en concreto se le solicitó al fabricante que expresamente no se incluyeran ningún tipo de aditivo, o antioxidante.

Si es relevante, esta diferencia de calidad en cuanto a la comparación de este trabajo con cualquier otro estudio, en el que en la composición de sus dietas se haya incluido harinas premium, LT, etc., y no de subproductos, ya que en principio los factores de conversión y tasas de crecimiento no serían trasladables en una comparación directa.

Tampoco económicamente es comparable directamente el precio entre estas materias primas de diferente calidad, siendo el precio medio que se refleja las bases de datos disponibles, el de la harina de pescado proveniente de Perú, y de un 65 % de proteína incluidos los costes hasta el puerto de destino por parte del vendedor (Index Mundi, 2022). Esto se debe a la gran cantidad de esta harina peruana de disponible en el mercado global y

a que las transacciones se quedan reflejadas de manera clara en precio y cantidad en las bases de datos públicas de exportaciones e importaciones. Mucho más difícil es acceder a los precios de compraventa de las materias primas de origen local ya que estas no se registran en bases de datos gubernamentales y quedan en el ámbito particular.

De manera simple y como ejemplo entre dos dietas A y B, una con harinas de subproductos (A) (58 % PC) y otra prémium (B) (70 % PC) en el que se incluyeran 200 g/kg de harina en su formulación, las harinas de subproductos aportarían una proteína cruda de 116 g/kg y las harinas prémium más de 140 g/kg. En este clarísimo ejemplo, un mismo porcentaje de inclusión de una «misma» materia prima puede suponer dependiendo de la proteína de las harinas prémium (> 70 %) más de un 20 % de diferencia de partida.

Aun sabiendo todo lo expuesto anteriormente y que es válido no solo para las harinas de pescado, sino también para cualesquiera otras materias primas, el patrón de comparación más usado por la industria y la investigación para medir la productividad y sostenibilidad es el Índice de Conversión Alimenticia (ICA), —o en inglés “*FCR*”—. O lo que es lo mismo, cuántos kilos de pienso necesito para producir un kilo de cabaña ganadera (independientemente de la especie).

Y es usado de manera general entre las diferentes especies cultivadas en acuicultura, o de la acuicultura frente a otras ganaderías.

VIII.3 Las dietas y su conversión en biomasa de manera eficiente

Si bien el ICA es ampliamente usado por la industria y en la investigación biológica o económica (Fry et al., 2018a, 2018b), el trabajo realizado por Fry colaboradores ha identificado al menos trece modos diferentes de evaluar la producción, la eficiencia, el rendimiento, y el uso de recursos de la acuicultura —ver Tabla S1 de los materiales complementarios de (Fry et al., 2018a, 2018b)—. No solo es usado en la medida de la eficiencia sino también en innumerables estudios supone el modo de entrada a los modelos de predicción por ejemplo del impacto ambiental de un sistema productivo a través de los estudios del análisis del ciclo de vida (LCA), u otros similares. Este trabajo resulta interesante desde el punto de vista de que hace un ejercicio crítico con el ICA como medida de la eficiencia de las dietas, y un intento de reemplazar este por la retención de proteína y calorías, para los animales de granja cultivados intensivamente.

Pero no solo Fry y colaboradores realizan una crítica sobre la forma de medir la eficiencia de la conversión del alimento en cabaña ganadera —ya que es una medida universal entre todas las ganaderías incluida la acuicultura—, otros autores también lo han criticado con anterioridad (Bethke et al., 2013; Jobling, 1983).

Y también existe una crítica a este tipo de estudios de crítica como el realizado por Fry y colaboradores como la que realiza acertadamente Tlustý et al., 2018 ya que es prácticamente imposible reflejar todas las condiciones existentes de cultivo y para todas las especies, o zonas de producción. Así Tlustý et al., 2018 critica con acierto que no se tengan en cuenta otros métodos de producción no intensivos menos dependientes en los piensos compuestos, o que tampoco se tengan en cuenta la alimentación de los ejemplares reproductores parte esencial del proceso de producción ganadera.

Nuestra crítica a Fry y colaboradores en este sentido es menos estricta, ya que se hubiera solucionado indicando claramente en el estudio que la comparación realizada es en sistemas intensivos y que no incluye otros sistemas —extensivos, semi-intensivos, integrados, policultivos, etc.—. En este sentido es necesario hacer una distinción clara entre sistemas de producción que necesitan alimentación suplementaria y los que no hay aporte por parte del ganadero o acuicultor (Cottrell et al., 2021). Sistemas que quizás son menos productivos por unidad de superficie cultivada, pero también son menos intensivos en el uso de los recursos necesarios para realizar una correcta alimentación suplementaria.

A nuestro parecer Jobling, 1983 es bastante más crítico sobre la metodología empleada en los estudios de nutrición y en su trabajo, totalmente válido cuarenta años después ya expone claramente la dificultad de comparar los trabajos entre diferentes cultivos, técnicas de cultivo, la terminología o el valor nutricional de las dietas que se evalúan, que a su entender —y en el nuestro— que lastran la comparación entre estos estudios «no existiendo puntos en común para la comparación» (Jobling, 1983). En este mismo sentido debemos reiterar en la validez de la revisión que realiza Fry et al., 2018a identificando en trabajos de investigación trece medidas diferentes de la eficiencia de la cabaña ganadera (Tabla S1 de los materiales suplementarios) entre ellos el FCA “*FCR*”.

VIII.4 La obsesión de la industria ganadera con el Factor de Conversión

Ciertamente parece que la industria ganadera está cómoda con el FCA o “FCR” utilizado de manera general en la medida de su eficiencia y de la sostenibilidad de la producción, considerándose el patrón oro, y su reducción un objetivo prioritario de la industria, y de su sostenibilidad ambiental (Hasan & Soto, 2017).

Generalizando, el consumo de menos kilos de pienso para hacer un kilo de canal puede que si suponga una reducción de emisiones de gases de efecto invernadero, pero sería muy razonable que se tuviera en cuenta el tipo de pienso que se utiliza, su contenido al menos en proteínas y grasas, y su coste económico. Ya que, un kilo de pienso no es una cantidad que se pueda usar como patrón de comparación dada su variabilidad en composición, calidad de las materias primas, etc., y su influencia de estas en su composición y por tanto en su precio. Si ya es difícil realizar dicha comparación entre piensos de acuicultura para diferentes especies según su nivel trófico, mucho más difícil resulta realizarlo con otro tipo de ganaderías. Es tradicional por parte del sector mostrar este tipo de diagramas basados en el factor de conversión para mostrar la mayor eficiencia de la acuicultura frente a otras ganaderías, figura que adaptamos de Fry y colaboradores, Figura 68.

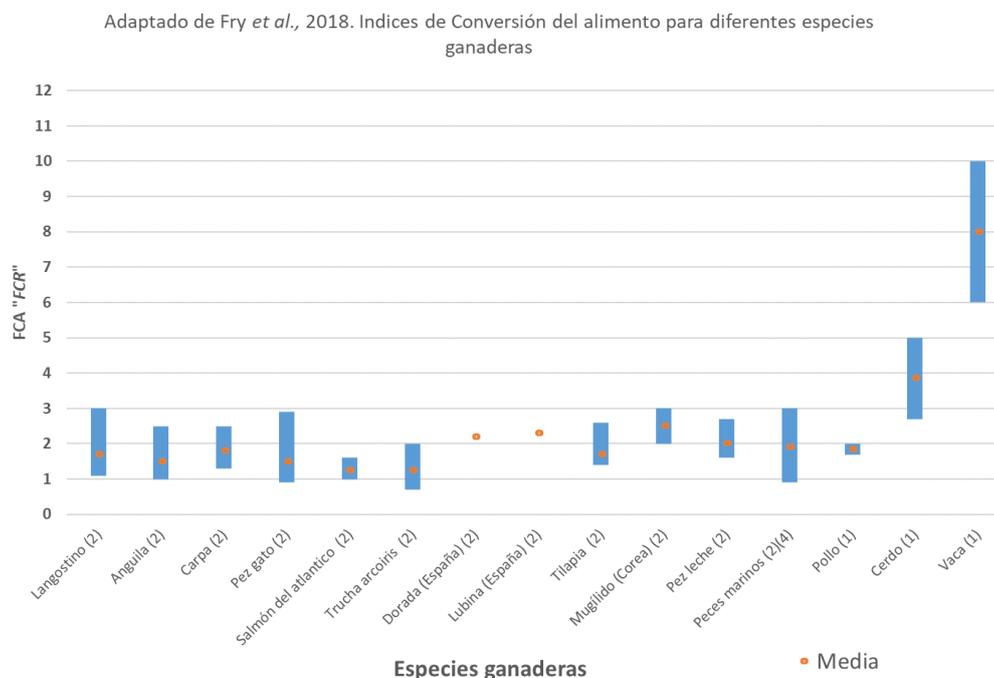


Figura 68. Índices de Conversión del Alimento para diferentes especies ganaderas. Adaptado de Fry *et al.*, 2018

Esta comodidad de la industria acuícola sobre todo de los salmónidos y especies carnívoras se plasma en premios como el del «Granjero del año», “*Farmer of the year*” otorgado por una conocida casa de piensos a nivel mundial al mejor desempeño en la alimentación de los centros de cultivo chilenos (Salmonexpert, 2022a, 2022b, 2022c, 2022d) y la obsesión por obtener “*FRC*” históricos queda plasmado también en otros medios de comunicación (Aqua Chile, 2017, 2019). Por el contrario, la industria acuícola de herbívoros u omnívoros ya que tradicionalmente usa piensos menos densos en proteína y energía evita dicha comparación, al ser sus factores de conversión significativamente peores como se puede comprobar en los datos presentados con anterioridad en la Figura 68.

Uno de los problemas con lo que nos hemos encontrado al realizar esta investigación es que muchos de los estudios realizados dentro de los pocos que hay es que se complementa la alimentación externa por el granjero, con la producción natural de los tanques de cultivo por lo que en estos sistemas el uso del ICA es bastante limitado. A nuestro parecer el principal problema del ICA es que es sencillamente «comparar peras con manzanas».

VIII.5 La necesaria comparación de los datos biológicos obtenidos en este trabajo con otros estudios

Así y por realizar una comparación con los datos de este experimento con otras producciones, y utilizando el citado ampliamente (casi 100 veces, más innumerables descargas, etc.) (artículo de Fry y colaboradores) como marco de comparación mostramos la Figura 69 adaptada. Sirvan los datos de su Tabla 1, y de la tabla S5 de los materiales complementarios adaptados en la Figura 69 de este trabajo (siguiente página), para ilustrar la gran variabilidad entre las dietas de las especies analizadas en proteína, (el resto de factores no se analizan, como energía) así como la gran diferencia entre los factores de conversión del alimento entre estas ganaderías.

En esta tabla, podemos observar los mínimos, máximos y medias de los ICA del alimento para un amplio número de especies, al final de la columna se han introducido los datos de dos capítulos de esta tesis, el IV (con dorada) y el V (con liseta). Así vemos cómo y esta remarcado con un cuadro intenso, tanto el salmón atlántico, la tilapia o en nuestro caso la liseta tienen unos valores muy similares si hacemos la simple cuenta de multiplicar el ICA medio por la cantidad en g/kg de proteína en el pienso. Y valores muy similares, aunque los ICA difieren muchísimo

para casi el resto de las especies. Excepto la vaca y la dorada (España) que son en principio los que necesitan más de un kilo de proteína para convertirlo en un kilo de cabaña ganadera.

Figura 69: Adaptada de Fry et al., 2018 (Tabla 1, y de la tabla S5 de los materiales complementarios)

Datos usados para calcular la retención proteica y calorica para las cabañas ganaderas seleccionadas

	ICA ("FCR")			Cantidad en el alimento ⁽²⁾			g proteína* kg ⁻¹
	Mínimo	Máximo	Media	Proteína cruda (%)			
				Mínimo	Máximo	Media	
Langostino ⁽²⁾	1,1	3	1,7				
Anguila ⁽²⁾	1	2,5	1,5				
Carpa ⁽²⁾	1,30	2,50	1,80	17,00	45,00	31,00	558,00
Pez gato ⁽²⁾	0,90	2,90	1,50	28,00	32,00	30,00	450,00
Salmón del atlantico ⁽²⁾	1,00	1,60	1,25	35,50	44,00	39,75	496,88
Trucha arcoiris ⁽²⁾	0,70	2,00	1,25	40,00	47,00	43,50	543,75
Dorada (España) ⁽²⁾	2,20		2,20			46,00	1012,00
Lubina (España) ⁽²⁾	2,30		2,30			46,00	1058,00
Tilapia ⁽²⁾	1,40	2,60	1,70	20,00	32,00	26,00	442,00
Mugílido (Corea) ⁽²⁾	2,00	3,00	2,50				
Pez leche ⁽²⁾	1,60	2,70	2,00				
Peces marinos ⁽²⁾⁽⁴⁾	0,90	3,00	1,90				
Pollo ⁽¹⁾	1,70	2,00	1,85	7,00	15,40	11,20	207,20
Cerdo ⁽¹⁾	2,70	5,00	3,85	18,00	23,00	20,50	789,25
Vaca ⁽¹⁾	6,00	10,00	8,00	13,20	20,90	17,05	1364,00
Mújol (este estudio) ⁽⁴⁾			1,68			28,60	480,48
Dieta A (Ti3) ⁽⁵⁾			2,64			33	871,20
Dieta B (Mar perla L) ⁽⁵⁾			1,94			56	1086,40
Dieta C (B40) ⁽⁵⁾			2,54			28,60	726,44
Dieta D (B70) ⁽⁵⁾			4,25			28,60	1215,50

ICA ("FCR")= Factor de conversión del alimento

⁽¹⁾ (Fry et al., 2018)

⁽²⁾ (Tacon & Metian, 2008)

⁽³⁾ (Oliva-Teles et al., 2022)

⁽⁴⁾ En este caso los FCA más bajos los presentan el rodaballo en España (FCA=1), y el bacalao noruego (FCA=0,9)

⁽⁵⁾ Mújol (este estudio) Calculado del Promedio del ICA de las dietas A, B, y C Tabla 11 (Capítulo V)

⁽⁴⁾ Dorada (este estudio) Datos Tabla 8 (Capítulo IV)

No evaluado Grasas (%)*

No evaluado Porción comestible

No evaluado Uso de FM/FOIFFO, etc.

Si estos datos los comparamos con las conversiones de nuestras doradas (todos marcados en azul) vemos como hay muy poca diferencia entre las teóricamente bien alimentadas del estudio de Fry y col., y las nuestras que recibieron una alimentación deficiente en MN y mN, así como en cantidad. Y si bien parece que los mejores datos de

conversión de gramos de proteína en el pienso a kg de dorada, los arrojan aquellas dietas que funcionaron razonablemente Dieta A y Dieta C, y que eran muy bajas en proteína y grasas.

Por un lado, tenemos que nuestros mújoles son igual de eficientes que un salmón o una tilapia y por otro que nuestras doradas son igual de no eficientes que las doradas de Fry y colaboradores (que referencia a [Tacon y Metian, 2008](#)).

Por otro lado, nosotros hemos parado de realizar la comparación evitando llegar al factor de porción comestible, o evitando realizar la comparación entre grasas.

Y por varias razones. La primera de ellas es que entendemos y sirva de crítica tajante a este tipo de trabajos es que medir con precisión no miden nada, así los valores de porción comestible son absolutamente subjetivos y muchas veces se traen a este tipo de estudios de manera descuidada (no es el caso del trabajo de Fry y col., pero si entendemos la producción ganadera como un modelo input – output en el que las entradas en este tipo de ganaderías controladas no hay aporte externo de ningún tipo de alimento la calidad de la entrada (pienso) es determinante, así no podemos comparar entre dos kilos de pienso para dorada sin tener en cuenta su formulación y materias primas, MN y mN, y estos datos normalmente son obviados en los estudios. Aunque tuviéramos esos datos de composición el problema es que debemos tenerlos en la misma unidad de medida, al igual que sucede con la formulación de las dietas de este trabajo. Así y aunque de las dietas comparadas en los capítulos anteriores Ti3, B40 y B70 y que ahora se traen a esta tabla 69 tenemos los datos de MN, no podemos compararlas en energía, sin ajustar sus valores, ya que las dietas B40 y B70 no tienen prácticamente carbohidratos, frente a la dieta Ti3. Y si volvemos a los datos de la tabla 69 para el salmón igual de eficiente que nuestro mújol o una tilapia, la composición media de las dietas para el salmón de engorde asciende a un 30 - 35 % de grasas (mejores o peores). O sea, que, a igual proteína consumida para hacer un kilo de pez, el salmón necesita cinco o seis veces más grasas y muchísima más energía por descontado.

Por otro lado, y quizás lo más preocupante de este tipo de estudios que es que no tenemos análisis de composición del animal entero. Así hay excelentes trabajos para animales pequeños (en peces no suelen ser de talla más grande de 50 -90 g), y excelentes trabajos son los del profesor Karapanagiotidis, ([Karapanagiotidis et al., 2014, 2015, 2019](#)). Pero estamos lejos de tener una tabla real de las composiciones por ejemplo de una dorada en todas sus etapas de desarrollo hasta su venta, que nos permita comparar cual ha sido la

retención de proteína y energía con un mínimo de certeza. Primero porque nadie ha hecho análisis de animales enteros reiteramos (ni de un pez, ni de una vaca), y segundo porque la parte que desperdiciamos es casi más en cantidad que la que aprovechamos. Así para una carpa común Fry y colaboradores estima una porción comestible de entre un 0,36 a 0,54 y para un salmón de 0,58 a 0,88, pues esto sin duda está mediado por la talla. Lo cual no es incierto, ya que a mayor talla mejor conversión de canal a alimento. Pero al introducirlo en este tipo de trabajos sesgamos sin duda los resultados, puesto que principalmente con lo que nos estamos quedando es con la parte comestible o “*edible weight*” que es el músculo, y que tiene una composición prácticamente igual para todas las especies.

En este sentido el profesor Oliva-Teles y colaboradores hacen un excelente trabajo respecto a analizar los requerimientos de proteína de innumerables especies (Oliva Teles et al., 2019). A este trabajo la única crítica que se le puede hacer es que establece la retención de proteína para el músculo así «la ingesta de proteína está linealmente relacionada con la ganancia de peso, mientras que la retención no» en unos valores de 187 g de proteína por cada kilo de peso (que es la composición de músculo) más o menos estable. Y fija también la eficiencia de la proteína cercana al 32 %.

Y los ratios de eficiencia de la proteína, o el metabolismo de las especies son muy similares (Cowey, 1995; Oliva Teles et al., 2019; Winberg, 1960) aunque evidentemente hay innumerables factores que pueden afectar a estos ratios, desde la cantidad y calidad de la alimentación aspecto que no nos vamos a cansar de reiterar, hasta las condiciones ambientales, o la exposición indeseable a patógenos, situaciones de estrés, heridas, etc. Quizás el trabajo de Lall & Tibbetts, 2009 sea uno de los que mejor recogen la complejidad de los factores que afectan al comportamiento de la alimentación en los peces, y por ende al crecimiento. Aunque quizás en la eficiencia no haya tantas diferencias como recogen otros autores, o hemos podido comprobar en los datos mostrados en la Figura 69, y en el análisis realizado.

VIII.6 Los precios de los piensos para la acuicultura

Y aunque pudiera pensarse que estamos hablando de la biología de las especies, este capítulo está íntegramente dedicado al análisis económico, y de ese aspecto estamos hablando, de eficiencia y de conversión de los “inputs” en “outputs”.

Siendo difícil establecer que exista una composición media para los piensos de acuicultura incluso para una misma especie, y aun no siendo partidario de utilizar este tipo de datos, los precios de los piensos, tanto los que se recogen en los datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, así como los obtenidos por comunicaciones personales podemos establecerlos de la siguiente. Y antes de la guerra de Ucrania y el COVID19, o ahora.

Para los piensos de dorada (MAPA & Subdirección General de Medios de Producción Ganaderos. Área de Alimentación Animal, 2021; Subdirección General de Medios de Producción Ganadera. Área de Alimentación Animal, 2022) se puede establecer un precio medio antes de 2019 de 950,00 € / t; para los piensos para herbívoros como la carpa o la tilapia estos varían alrededor de un 25 % menos precio, por lo que podríamos estimar que para 2019 sería un precio medio de 780,00 € / t. Después de los acontecimientos geopolíticos negativos de estos últimos años podemos estimar una subida media de un 30 % por lo que actualmente estaríamos hablando de un precio en España de 1250,00 € /t para dorada y de actualmente 1000,00 € / t para herbívoros. Si consultamos otras fuentes para otros países del área mediterránea que su acuicultura ha despegado recientemente como es Egipto, los datos obtenidos por comunicación personal para piensos de aproximadamente un 30 % de proteína, antes de 2019 era de unos 572,00 € / t , y actualmente con unas fluctuaciones muy grandes alrededor de 740 – 790 € /t, mientras que el pienso para dorada no varía respecto a España y su precio es de actualmente unos 1239,00 € (quizás debido a que sea principalmente importado por casas de piensos europeas).

VIII.7 Integración con los datos de producción con los precios de los piensos. Análisis de los costes de la alimentación España – Egipto para la producción piscícola de diferentes especies. Evaluado en dos escenarios: pre-COVID19 y guerra de Ucrania, y actual (a 8/2022)

Si estos datos los ponemos en conjunto con los datos de la Figura anterior, podemos hacer un sencillo análisis de coste de la producción de tilapia y similares frente a una producción de dorada en España (atendiendo solo al factor alimentación) Así en la Tabla 16 se muestran los datos del precio de producir un kilo de pez antes (2019) y post pandemia, guerra de Ucrania, etc.

En esta Tabla 16, podemos ver como el precio de la proteína por kilo es muy similar para ambos tipos de dietas, paradójicamente resulta más cara en proporción el kilo de proteína en España para producir peces de bajo nivel trófico (3,33 €/kg) frente a (2,84 €/kg).

Sin duda la ventaja competitiva para las empresas ubicadas en Egipto es que para las dietas de Tilapia y similares pueden utilizar subproductos o cereales locales, mientras que si intentan cultivar dorada esa diferencia se diluye debido a que tienen que importar materias primas como el aceite y las harinas de pescado, o directamente los piensos (que tendrían un coste igual) mientras que en la fabricación de piensos para Tilapia tienen un 25 % de margen de menor coste del pienso. Esto en producción es mucho.

Por otro lado, estas especies (tilapia, mújoles, etc.) también toman ventaja de otros sistemas como el biofloc, o el alimento natural de los estanques por lo que creemos que el ICA o FCR es aún menor. Y en parte explica tanto porque los países menos desarrollados se pueden permitir incrementar su producción frente a los países que tradicionalmente cultivan carnívoros y que se hayan estancados.

Por otro lado, estos costes para la dorada en España están muy cerca de los precios mínimos en origen para la especie o de los precios mínimos para los mayoristas lo que supone un riesgo financiero y una posibilidad muy cercana de vender a pérdidas. Datos de precios de venta no mostrados (extraídos de las estadísticas de Mercamadrid ([Mercamadrid, 2022](#))).

Aunque se pudiera pensar que incluir materias primas de muy bajo coste como las levaduras de desecho en las formulaciones de las dietas haría reducir su precio y por ende hacer estas dietas más rentables, depender de terceros fabricantes implica aceptar un precio no solo por el importe del coste en el mercado de las materias primas, sino también por sus servicios, instalaciones, Know-how, etc. y los costes de producir en un país desarrollado como España, este aspecto necesita de un mayor estudio y profundización pero como ya comentamos con anterioridad, no existe ningún estudio de la cadena de valor de los piensos en acuicultura, aunque estos suponen más del 50 % de todos los costes.

Tabla 16: Análisis del coste de la alimentación de producir tilapia y similares o dorada en España o Egipto (2019, pre COVID) y ahora (8/2022)

Precio de piensos engorde (€/t)		2019	2022
Egipto	Dorada	sin dato	1.239,00 €
	Tilapia y similares	572,00 €	750,00 €
España	Dorada	950,00 €	1.250,00 €
	Tilapia y similares	780,00 €	1.000,00 €

Precio €/ kg proteína		2019	2022
Egipto	Dorada	sin dato	2,82 €
	Tilapia y similares	1,91 €	2,50 €
España	Dorada	2,16 €	2,84 €
	Tilapia y similares	2,60 €	3,33 €

Precio pienso /kg pez		FCR *		
Egipto	Dorada	2,2	sin dato	2,73 €
	Tilapia y similares	1,7	0,97 €	1,28 €
España	Dorada	2,2	2,09 €	2,75 €
	Tilapia y similares	1,7	1,33 €	1,70 €

Este estudio	<i>Chelon labrosus</i> 950€/t**	1,7	1,29 €	1,62 €
---------------------	------------------------------------	------------	--------	--------

* (Fry et al., 2018)

**Precio dado por un fabricante de piensos europeo para dieta B70 (2022)

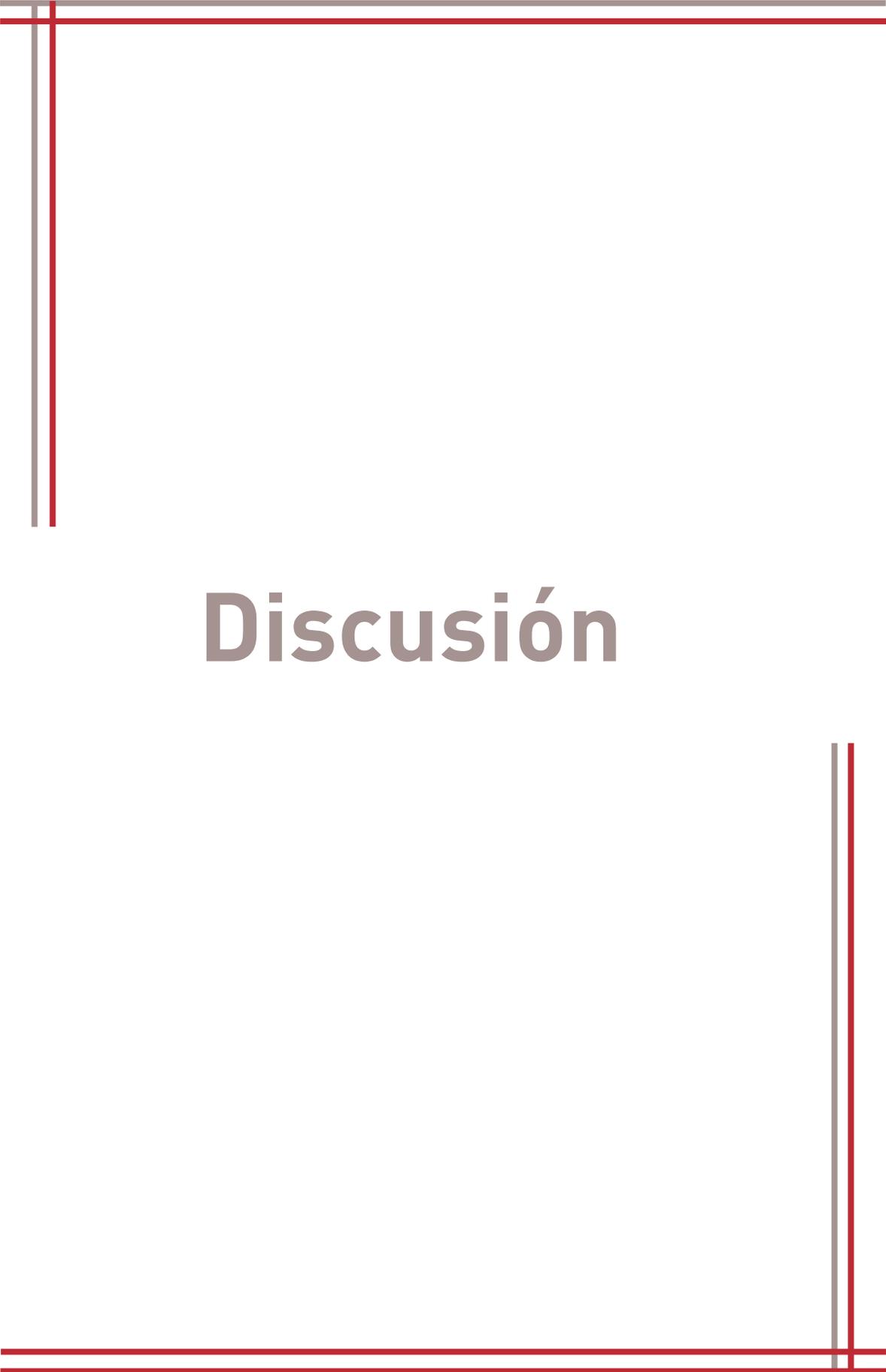
*** Precio Dieta B70 (25 % menos del precio 2022)

VIII. Bibliografía

- Aqua Chile. (2017, January 2). Alimentación de peces: La industria va tras FCR históricos. *Aqua*. <https://www.aqua.cl/reportajes/alimentacion-peces-la-industria-va-tras-fcr-historicos/>
- Aqua Chile. (2019, January 30). “Farmer of the Year”: Reconocen resultados en tres centros de cultivo. *Aqua*. <https://www.aqua.cl/2019/01/30/farmer-of-the-year-reconocen-resultados-tres-centros-cultivo/>
- Bethke, E., Bernreuther, M., & Tallman, R. F. (2013). *Feed Efficiency Versus Feed Conversion Ratio— Demonstrated on Feeding Experiments with Juvenile Cod (Gadus Morhua)*. <http://www.ssrn.com/abstract=2313137>
- CESFAC. (2022). *Informes de mercados y estadística del sector de alimentos compuestos para animales*. CESFAC Confederación Española de Fabricantes de Alimentos Compuestos para animales. <https://cesfac.es/es/quienes-somos/el-sector-en-cifras>
- Cottrell, R. S., Metian, M., Froehlich, H. E., Blanchard, J. L., Sand Jacobsen, N., McIntyre, P. B., Nash, K. L., Williams, D. R., Bouwman, L., Gephart, J. A., Kuempel, C. D., Moran, D. D., Troell, M., & Halpern, B. S. (2021). Time to rethink trophic levels in aquaculture policy. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1583–1593. <https://doi.org/10.1111/raq.12535>
- Cowey, C. B. (1995). Protein and amino acid requirements: A critique of methods. *Journal of Applied Ichthyology*, 11(3–4), 199–204. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1995.tb00019.x>
- Feedipedia - Animal Feed Resources Information System - INRAE CIRAD AFZ and FAO. (2022a). *Fish meal, 60-68% protein as fed | Feedipedia*. <https://www.feedipedia.org/node/11687>
- Feedipedia - Animal Feed Resources Information System - INRAE CIRAD AFZ and FAO. (2022b). *Fish meal, low protein | Feedipedia*. <https://www.feedipedia.org/node/11686>
- Fry, J. P., Mailloux, N. A., Love, D. C., Milli, M. C., & Cao, L. (2018a). Feed conversion efficiency in aquaculture: Do we measure it correctly? *Environmental Research Letters*, 13(2), 024017. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aaa273>
- Fry, J. P., Mailloux, N. A., Love, D. C., Milli, M. C., & Cao, L. (2018b). Corrigendum: Feed conversion efficiency in aquaculture: do we measure it correctly? (2018 *Environ. Res. Lett.* 13 024017). *Environmental Research Letters*, 13(7), 079502. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aad007>
- Fundación Española Para el Desarrollo de la Nutrición Animal. (2022). *Harina de Pescado FEDNA*. http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/harina-de-pescado-70913
- Hasan, M. R., & Soto, D. (2017). *Improving feed conversion ratio and its impact on reducing greenhouse gas emissions in aquaculture*. FAO. <https://www.fao.org/documents/card/es/c/83b8df36-bfaf-4d63-ac0a-0982bb6ebb7/>
- Hua, K., Cobcroft, J. M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D. R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M. J., Zeng, C., Zenger, K., & Strugnell, J. M. (2019). The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets. *One Earth*, 1(3), 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.018>

- IFFO The Marine Ingredients Organisation. (2022, July). *Producción | IFFO - The Marine Ingredients Organisation*. <https://www.iffo.com/es/produccion>
- Index Mundi. (2022). *Fishmeal—Monthly Price—Commodity Prices*. <https://www.indexmundi.com/commodities/?commodity=fish-meal&months=240>
- Jobling, M. (1983). A short review and critique of methodology used in fish growth and nutrition studies. *Journal of Fish Biology*, 23(6), 685–703. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1983.tb02946.x>
- Karapanagiotidis, I. T., Karalazos, V., Kougioumtzis, N., Tsiamis, V., Tsiara, V., Neofitou, C., Karacostas, I., & Nengas, I. (2014). Growth and Feed Utilization by Golden Grey Mullet (*Liza aurata*) in a Coastal Lagoon Ecosystem, Fed Compound Feeds with Varying Protein Levels. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 66, 10. <https://doi.org/10.46989/001c.20784>
- Karapanagiotidis, I. T., Mente, E., Berillis, P., & Rotllant, G. (2015). Measurement of the Feed Consumption of *Nephrops norvegicus* Feeding on Different Diets and its Effect on Body Nutrient Composition and Digestive Gland Histology. *Journal of Crustacean Biology*, 35(1), 11–19. <https://doi.org/10.1163/1937240X-00002299>
- Karapanagiotidis, I. T., Psafakis, P., Mente, E., Malandrakis, E., & Golomazou, E. (2019). Effect of fishmeal replacement by poultry by-product meal on growth performance, proximate composition, digestive enzyme activity, haematological parameters and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Nutrition*, 25(1), 3–14. <https://doi.org/10.1111/anu.12824>
- Lall, S. P., & Tibbetts, S. M. (2009). Nutrition, Feeding, and Behavior of Fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 12(2), 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2009.01.005>
- MAPA, & Subdirección General de Medios de Producción Ganaderos. Área de Alimentación Animal. (2021). *Datos de producción de piensos 2020* (p. 45) [Estadística oficial]. Subdirección General de Medios de Producción Ganaderos. Área de Alimentación Animal. Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. <https://bit.ly/3KN6ePR>
- Mercamadrid. (2022, August). *Estadísticas Mercamadrid. Mercado central de pescados*. Mercamadrid. <https://www.mercamadrid.es/estadisticas/>
- Oliva Teles, A., Couto, A., Enes, P., & Peres, H. (2019). Dietary protein requirements of fish – a meta-analysis. *Reviews in Aquaculture*, raq.12391. <https://doi.org/10.1111/raq.12391>
- Oliva-Teles, A., Enes, P., Couto, A., & Peres, H. (2022). Replacing fish meal and fish oil in industrial fish feeds. In *Feed and Feeding Practices in Aquaculture* (pp. 231–268). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821598-2.00011-4>
- Oliva-Teles, A., Enes, P., & Peres, H. (2015). 8—Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish. In D. A. Davis (Ed.), *Feed and Feeding Practices in Aquaculture* (pp. 203–233). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100506-4.00008-8>

- Salmonexpert. (2022a, January 29). Salmofood reconoce a centros de salmón que obtuvieron los mejores resultados—SalmonExpert.cl. *Salmonexpert*. <https://www.salmonexpert.cl/article/salmofood-reconoce-a-centros-de-salmon-que-obtuvieron-los-mejores-resultados/>
- Salmonexpert. (2022b, February 14). Tres centros de Cermaq Chile son reconocidos por sus resultados productivos—SalmonExpert.cl. *Salmonexpert*. <https://www.salmonexpert.cl/article/tres-centros-de-cermaq-chile-son-reconocidos-por-sus-resultados-productivos/>
- Salmonexpert. (2022c, May 4). Los resultados de los mejores centros de salmón según ranking de BioMar Chile. *Salmonexpert*. <https://www.salmonexpert.cl/article/biomar-reconoce-a-los-centros-de-salmon-con-mejores-resultados-en-chile/>
- Salmonexpert. (2022d, September 2). BioMar Chile reconoce a los mejores productores de salmón en 2021—SalmonExpert.cl. *Salmonexpert*. <https://www.salmonexpert.cl/article/biomar-reconoce-a-los-productores-del-ano/>
- Subdirección General de Medios de Producción Ganadera. Área de Alimentación Animal. (2022). *Estimación de Precios de piensos: Julio 2022 (Semanas 27 a 30)* (p. 17) [Estadística oficial]. Subdirección General de Medios de Producción Ganadera. Área de Alimentación Animal. Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/alimentacion-animal/acceso-publico/precios.aspx>
- Tlusty, M., Tyedmers, P., Ziegler, F., Jonell, M., Henriksson, P. J., Newton, R., Little, D., Fry, J., Love, D., & Cao, L. (2018). Commentary: Comparing efficiency in aquatic and terrestrial animal production systems. *Environmental Research Letters*, 13(12), 128001. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aae945>
- Winberg, G. G. (1960). Rate of Metabolism and Food Requirements of Fishes. Translation of 'Intensivnost' obmena i pishchevye potrebnosti ryb. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada, Translation Series No. 194*, 286.



Discusión

III.1 Las levaduras de desecho como materias primas en piscicultura y el estado inmunitario de los peces

Siendo necesario quizás una mayor profundización en algún aspecto de este trabajo, pero también siendo consciente de que no se pueden abordar todo el campo que abarca este texto con la misma profundidad, los resultados obtenidos en la parte biológica se dan por discutidos en su mayor parte en cada capítulo.

Aunque en principio el factor de tanta inclusión de levaduras en las dietas se pensaba que podría ser un factor a tener en cuenta en cuanto a la salud de los peces, o la falta de aditivos en las dietas, vitaminas, minerales, etc. Ya que las formulaciones se redujeron al mínimo de mN, y no añadieron aditivos, y tan solo se aportaron los mN que vienen de natural con materias primas que componen las dietas, una pequeña cantidad de microalgas, y ningún elemento más que pudiera distorsionar la realidad de validar las levaduras como materias primas para dietas para piscicultura. Este modo de formular parece que no ha tenido una influencia negativa en general en los peces (recordemos que las dietas industriales si llevan aditivos). Por el mismo motivo que se le exigió al proveedor que no incluyera antioxidantes, anti-fúngicos, etc. que las dietas industriales si incluyen. A veces la salud no nos la da lo que comemos, sino lo que no comemos.

Anteriormente tampoco había habido problema con las levaduras de desecho, ni se habían detectado factores antinutricionales, promotores o depresores del sistema inmune de los peces por esta gran cantidad de inclusión. Pero extraer conclusiones es difícil ya que tampoco son unas dietas secas extruidas de las que normalmente se utilizan tanto en las piscifactorías como en la investigación. Sin duda queda mucho camino por recorrer en este sentido.

III.2 Las harinas de pescado su sustitución y la salud de los peces

Este aspecto si quedaba pendiente de valorar, ya que la sustitución por harinas de subproductos es cada vez más habitual en las dietas industriales, pero en una cantidad reiteramos indeterminada. Actualmente el sector usa un 35 % del total de las harinas de pescado provenientes de subproductos, pero eso es una cantidad global y no individualizada por especie. Quizás sean más utilizadas en peces con requerimientos nutricionales menos exigentes como las tilapias o peces gato, lo cierto es que los piensos de alevinaje o reproductores no prescinden de las harinas de alta calidad o LT, Prime, etc. Siendo necesario abordar aunque sea en última instancia su rol en la salud de los peces de manera general, ya que en los experimentos realizados tampoco se ha detectado ningún factor antinutricional o depresor del crecimiento por su uso.

El valor de la cantidad proteínica y la calidad reflejada en la suma de aminoácidos de la composición de las harinas de pescado ha sido evaluada numerosas veces en diferentes estudios y revisiones, aunque no es objeto de esta tesis hacer una revisión de su composición y características. El factor que entendemos relevante para este trabajo —y que es necesario reflejar— es la mayor limitación que existe para su uso en los piensos compuestos: Su disponibilidad en cantidad, y también en calidad. Diferentes especies de peces, crustáceos, moluscos bivalvos, etc. y dependiendo de la fecha de su captura van a producir diferentes perfiles nutricionales de harinas. Sirva de claro ejemplo de esta variabilidad de las harinas de pescado como materias primas la publicación de Valverde et al., 2013. En esta publicación se evalúan los perfiles de composición de diferentes harinas de especies marinas —incluido los mójoles— para buscar posibles fuentes proteicas para las dietas de cefalópodos (altamente exigentes en sus requerimientos nutricionales). Estudio que concluye de manera acertada que es la complementariedad con otras materias primas, y la adición de aminoácidos cristalinos a las dietas la mejor de las soluciones para cubrir el perfil nutricional requerido (Valverde et al., 2013).

Otros trabajos evalúan la diferente calidad de las harinas de pescado para la dorada (Aksnes et al., 1997; Deguara, 1997; Vergara et al., 1999), o en salmón atlántico (Mundheim et al., 2004; Pike et al., 1990; Stewart Anderson et al., 1993). Pero es difícil comprar entre estos trabajos y los actuales por los grandes avances e innovaciones en la fabricación de

piensos que ha hecho el sector acuícola en las tres últimas décadas. Pike, 1992, por ejemplo, refleja el escaso éxito y bajos rendimientos de la sustitución de harinas de pescado por materias primas vegetales, aunque tan solo 30 años después, la sustitución por vegetales es una realidad industrial, y gran parte de los factores que la limitaban se han superado. Factores limitantes que provenían fundamentalmente de compuestos antinutricionales que presentan en su composición las materias primas vegetales, y que, mediante su tratamiento térmico, o procesado se han mitigado (Francis et al., 2001; Krogdahl et al., 2022).

También dificulta realizar una comparación las diferentes formas de fabricación de las dietas evaluadas en algunos de estos trabajos. Así se prueban piensos extruidos (más densos en energía y con mayor cantidad de grasas) frente a piensos peletizados producidos con tecnologías no tan avanzadas y que dificultaban la inclusión de materias primas ahora comunes en la formulación de las dietas industriales para peces carnívoros como es la soja (Vergara et al., 1999). Otra dificultad para comparar estos trabajos es que las harinas evaluadas son muy similares con digestibilidades testadas en visón, de entre un 85 % y el 90 % y en ningún momento utilizan harina de subproductos. Incluso se prueban mezclas de estas harinas de buena calidad y estándar con diferentes niveles de inclusión de aceites de pescado que se incluyen en las dietas en una cantidad elevada, así en Mundheim et al., 2004. la cantidad de proteína supera el 40 % en todas las dietas y las grasas rondan el 30 % de la composición —tanto en las de alta calidad como en las de calidad media—. Igual sucede con las dietas de Vergara et al., 1999 en las que la proteína alcanza del 48 al 50 % y los lípidos oscilan entre un mínimo de un 15 % y un máximo de un 28 % en las dietas extruidas. Esto reiteramos atendiendo a los estándares de oro de la industria para la harina de pescado de baja temperatura, y los altos requisitos como carnívoros de las especies utilizadas en estos trabajos —el salmón atlántico y la dorada—

En todos estos trabajos citados con anterioridad se recogen pequeñas ventajas en el crecimiento a favor de las harinas de mayor calidad y mayor digestibilidad. Y aunque no se trata de hacer una revisión extensa sobre la calidad de las harinas de pescado, sin duda esta mayor calidad influye sin duda en el crecimiento. Del mismo modo la modificación en el balance de aminoácidos por el uso de unos perfiles proteicos u otros al seleccionar las diferentes materias primas puede influir en la salud de los peces, en otros animales o en la de las personas (Andersen et al., 2016; Kim et al., 2006; Li et al., 2009; Oliva-Teles et al., 2022; Wu, 2013).

Aunque los cambios en las relaciones entre la composición de las materias primas en proteína y aminoácidos en la salud no son absolutamente claras, es más patente el deterioro de la salud cuando se modifican los perfiles de aminoácidos de materias primas en este caso animales y marinas (harinas de pescado) por perfiles de proteína de las plantas en la que la composición entre ambas materias primas difiere de manera relevante, produciéndose un deterioro de la salud de los peces en algunos casos, y en otros no (Oliva-Teles et al., 2022), y no es tan relevante cuando lo que se modifica es entre diferentes tipos de harinas de pescado (que tienen mayor similitud en su composición de aminoácidos).

En este caso el perfil de aminoácidos de las harinas de subproductos no lo podemos considerar el mejor, pero si suficiente ya que los peces no han tenido mayor problema en crecer. En las dietas formuladas durante este trabajo la cantidad de proteína que aporta la harina de pescado de subproductos frente a las formulaciones de otros estudios o las dietas industriales hay que decir que es reducido, aproximadamente un 30 % de la cantidad de proteína, siendo el resto proteína de las levaduras de desecho. Por eso debemos reiterar que, y aunque es necesario poner de manifiesto estas diferencias en la calidad de las materias primas no se considera un aspecto relevante que haya influido en el crecimiento mayor o menor de los peces durante los experimentos.

III.3 La valoración bioeconómica de las dietas

Aunque es parte necesaria y fundamental de todo análisis económico en acuicultura la parte de la formación de los precios de los productos que el acuicultor va a poner en el mercado, su competencia con los precios de los productos pesqueros, etc. Ha sido imposible por extensión incluir esa parte del trabajo que está en parte hecho, pero que faltan algunos datos (difíciles de conseguir) para que su integración con los datos de producción permita hacer algún análisis mucho más exhaustivo. En definitiva y aunque los mújoles en el mercado minorista en nuestro país tienen un precio que podríamos considerar alto. Ya que un mújol de estero tiene un precio que ronda los 10 € / kg, el secreto estadístico sobre su producción, o la falta de comunicación de los datos por los productores, u otras causas, como podría ser una mala comunicación de los datos.

En Andalucía al año se comercializan aproximadamente 50.000 kg de mújol con un precio en origen de 2,59 €. Y reiteramos su precio de comercialización al detalle son más de 10,00 € normalmente. Por lo que hay un escalón donde entra la parte de los mayoristas mucho más amplio que para otras especies pesqueras o de acuicultura, sin que por ahora se hayan conseguido datos coherentes que faciliten una explicación. Quizás como Seneca en su anécdota recogía se deba a los precios de subasta fruto de que algunos locos están dispuestos a pagarlos a un precio alto en el mercado. Por lo que este aspecto necesita más trabajo. Ya que sería interesante integrarlo con el análisis realizado.

IV. Conclusiones



Anguilla anguilla (Linnaeus, 1758)

(latín anguilla, nombre del pez) (Barriuso, 1986)
Río Guadalquivir (La Horcada) - 1998 (Foto: A. M. Arias)
Derechos cedidos por M. Arias, www.ictiotermin.es

A la vista de los resultados científicos obtenidos podemos concluir que:

- 1.) El *Chelon labrosus* es una especie excelente para la acuicultura entendida de otro modo que la que actualmente se viene realizando en España, así su manejo y requerimientos nutricionales parece que se adaptan mal a las dietas con alto contenido en energía más parecidas a su alimentación natural.
- 2.) El manejo zootécnico del *C. labrosus* difiere del tradicional que se realiza con especies carnívoras y es difícil alimentarlos en la superficie, por lo que se recomienda que no se usen piensos flotantes en su alimentación.
- 3.) La mayor limitación para la expansión de su cultivo es la falta de adaptación a los sistemas súper-intensivos, y la falta de dietas industriales en el mercado. Cuando las dietas son aceptadas y suministradas en una cantidad equilibrada son capaces de crecer al mismo ritmo que otras especies de la acuicultura mediterránea, incluida la dorada.
- 4.) La falta de agresividad y ninguna tendencia al canibalismo lo hace una especie interesante para su cultivo desde el punto de vista de reducir la transmisión horizontal de patógenos entre los ejemplares estabulados.
- 5.) La liseta y la dorada confirma que son especies resistentes incluso en condiciones de alimentación sub-óptima y capaces de montar una adecuada respuesta inmunitaria en condiciones de restricción de recursos nutricionales tanto en macronutrientes como en micronutrientes. E incluso frente a un patógeno oportunista como *T. soleae* aun siendo alimentados deficitariamente.
- 6.) Hasta la fecha la máxima inclusión de levaduras de desecho se ha conseguido establecer en un 62,5 % sobre peso húmedo, junto con un 20 % de harinas de subproductos del sector conservero de bajo nivel proteico, y un 6,5 % de aceites de pescado del mismo origen.
- 7.) La valoración económica de la sustitución de las harinas de pescado realizada por inclusión de subproductos del sector cervecero es satisfactoria. Aunque hay que reconocer que determinados aspectos de la sostenibilidad del sector piscícola necesitan ser abordados con mayor profundidad, ya que de estos cálculos depende la medida correcta de la sostenibilidad de la industria, que a veces puede ofrecer una sin querer una medida sesgada.