



FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y AMBIENTALES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



USO DE COMPUESTOS MULTIBIÓTICOS PROCEDENTES DE MACROALGAS EN LA DIETA  
PARA LA EVALUACIÓN DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y DE CALIDAD DE AGUA FRENTE  
A UN RETO DE HIPOXIA

LUCÍA MORENO GARRIDO

Puerto Real, a 14 de septiembre de 2023

TRABAJO FIN DE MÁSTER (PERFIL INVESTIGADOR)  
MÁSTER UNIVERSITARIO EN ACUICULTURA Y PESCA

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo ha sido financiado por la empresa *Biotechnology Biopolym S.A.* (Cúllar Vega, Granada) gracias a un Contrato de Transferencia OTRI con el Departamento de Biología de la Universidad de Cádiz, con Ref. OT2021-134. Es de agradecimiento la beca INICIA-TC-MÁSTER cofundada por la Universidad de Cádiz y *Biotechnology Biopolym S.A.*

Todos los piensos experimentales utilizados en este trabajo han sido elaborados en el Servicio de Dietas Experimentales de los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Almería (<https://ual.es/universidad/serviciosgenerales/tecnicos>).

# ÍNDICE

Resumen

Abstract

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1-14</b>
1.1. La acuicultura en la actualidad .....	1-4
1.2. Hipoxia en acuicultura .....	4-5
1.3. Respuesta fisiológica al estrés .....	5-8
1.4. Estrés por hipoxia .....	8-9
1.5. Alternativas y mejoras de atenuación de estrés .....	9-11
1.6. Calidad de agua .....	11-12
1.7. La dorada como especie de interés .....	12-14
1.8. Objetivos .....	14
<b>2. Material y Métodos</b> .....	<b>15-19</b>
2.1. Diseño experimental .....	15-16
2.2. Obtención de datos biométricos y muestras biológicas .....	16-17
2.3. Índices zootécnicos y somáticos .....	17
2.4. Análisis metabólico .....	17-18
2.5. Análisis de agua .....	19
2.6. Análisis estadístico .....	19
<b>3. Resultados</b> .....	<b>20-28</b>
3.1. Crecimiento y parámetros biométricos .....	20-21
3.2. Metabolitos plasmáticos .....	22-23
3.3. Metabolitos hepáticos .....	24-25
3.4. Metabolitos musculares .....	26-27
3.5. Calidad de agua .....	28
<b>4. Discusión</b> .....	<b>29-34</b>
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>35</b>
<b>6. Bibliografía</b> .....	<b>36-40</b>

ANEXOS

## Resumen

El presente estudio permitió evaluar el efecto ocasionado por la suplementación de un nutraceutico simbiótico natural a base de hidrolizados de macroalgas, alginato y extracciones enzimático-bacterianas, producido por *Biotechnology Biopolym S.A.*, a diferentes dosis (1% y 3,5%) en dietas con alto porcentaje de origen vegetal sobre juveniles de dorada (*Sparus aurata*) sometidos a hipoxia moderada durante 24 horas, tras un periodo de alimentación de 91 días. Los análisis finales mostraron una atenuación de los efectos del estrés provocados por la hipoxia moderada en aquellos individuos suplementados, reflejada en los menores niveles de cortisol liberados al plasma y corroborada por la orquestación metabólica que marcan el resto de metabolitos plasmáticos, hepáticos y musculares estudiados, demostrando la mejora en la distribución y rendimiento energético. Además, el análisis de calidad de agua reveló una menor liberación de especies de nitrógeno (amonio y nitrito) al medio en los grupos suplementados, sugiriendo mejoras en la digestibilidad y asimilación de los nutrientes que igualmente confirman el conjunto de respuestas obtenidas en los análisis realizados. Los resultados ponen de manifiesto el empleo de este tipo de compuestos nutraceuticos naturales con función atenuante como una alternativa favorable en acuicultura.

## **Abstract**

The present study allowed to evaluate the effect caused by the supplementation of a natural symbiotic nutraceutical based on macroalgae hydrolysates, alginate and enzymatic-bacterial extractions, produced by Biotechnology Biopolym S.A., at different doses (1% and 3.5%) in diets with a high percentage of vegetable origin on juvenile sea bream (*Sparus aurata*) subjected to moderate hypoxia for 24 hours, after a feeding period of 91 days. The final analyses showed an attenuation of the effects of stress caused by moderate hypoxia in those individuals supplemented, reflected in the lower levels of cortisol released into the plasma and corroborated by the metabolic orchestration marked by the rest of plasma, liver and muscle metabolites studied, demonstrating the improvement in energy distribution and performance. In addition, the water quality analysis revealed a lower release of nitrogen species (ammonium and nitrite) to the environment in the supplemented groups, suggesting improvements in the digestibility and assimilation of nutrients that also confirm the set of responses obtained in the analyses carried out. The results highlight the use of this type of natural nutraceutical compounds with a mitigating function as a favourable alternative in aquaculture.

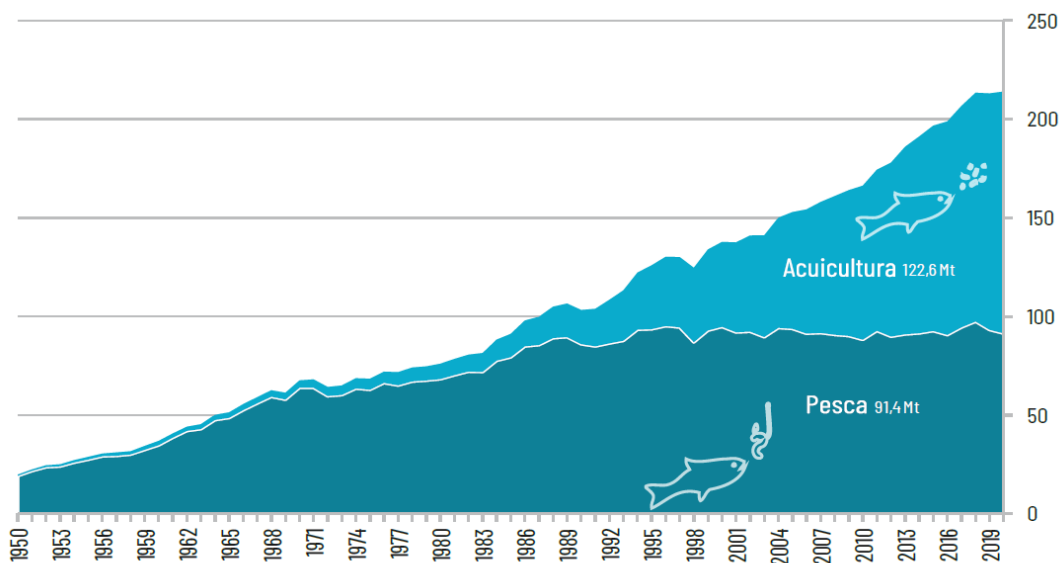
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. La acuicultura en la actualidad

La realidad climática a la que se enfrenta el sector acuícola supone una constante evolución y adaptación a los cambios que afectan al medio acuático. Teniendo en cuenta que estos cambios se proyectan directamente sobre los recursos naturales, así como en su producción, se deberán desarrollar nuevas vías o alternativas para generar una oferta de alimento que cubra la demanda futura (FAO, 2022) y, a su vez, se adapte a los cambios ambientales que acontecen. Las pesquerías han quedado estancadas, mostrando sobreexplotación de los recursos marinos naturales y siendo insuficiente e imposible su producción para abastecer la población (estimada en 10 mil millones de personas en 2050, según la FAO en 2017), quedando descartadas y dando paso a la acuicultura como principal fuente de alimento de origen marino. Es por ello que esta actividad se encuentra en continuo crecimiento y desarrollo, demostrando su alto potencial y contribución a una buena nutrición y seguridad alimentaria (FAO, 2022). Todo esto se enmarca, de forma tanto directa como transversal, con el concepto surgido recientemente de “*One Health*” (“una única salud”), el cual define tres pilares de suma importancia a nivel global que relacionan la “salud animal” (o bienestar animal) de los ejemplares cultivados con ii) la “salud medioambiental”, de modo que los sistemas productivos tengan el mínimo impacto posible sobre el ambiente en el que se realiza la actividad, pero iii) repercutiendo a su vez de forma positiva en la “salud humana” al generarse productos de alta calidad, como es el caso de los peces de acuicultura (FAO, 2022).

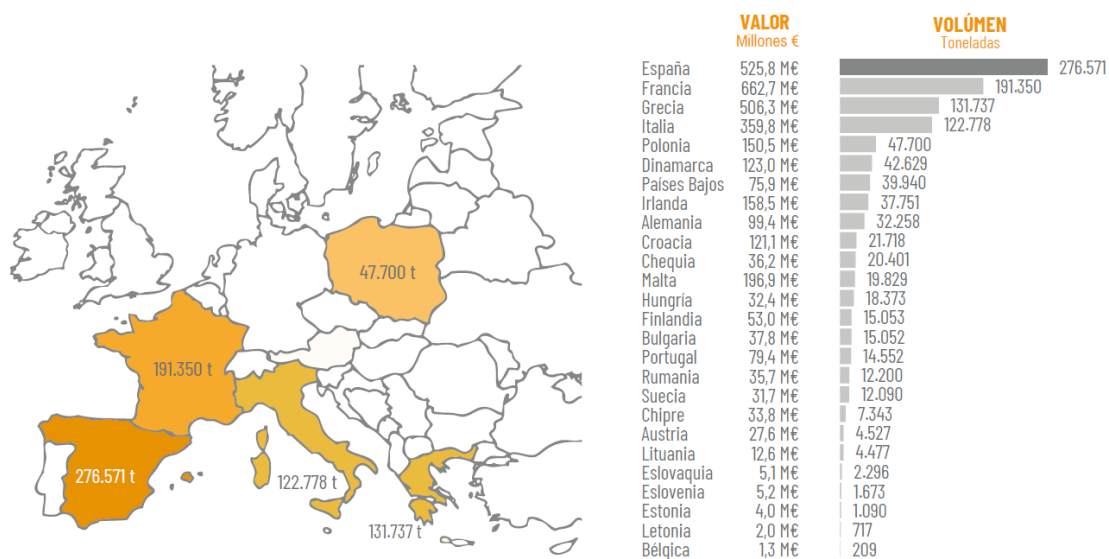
El último informe publicado por la FAO (2022), concluyó un récord en producción acuícola y pesquera, con un total de 214 millones de toneladas. Así mismo, el consumo per cápita de alimentos acuáticos (20,5 kg en 2019) muestra un aumento del 3% anual desde 1961 el cual, siendo comparado con la tasa de crecimiento de la población mundial de 1,6%, es casi el doble, dando a entender una mayor demanda y, por tanto, la necesidad de corresponderla. Por otro lado, la producción acuícola mundial estimada en 2022, alcanzó 122,6 millones de toneladas, siendo un 2,3% mayor que el año anterior y superando a la pesca extractiva por 31,2 millones de toneladas.

En la Figura 1 se puede apreciar la tendencia que siguen la producción pesquera y acuícola, siendo llamativamente observable el crecimiento de la producción acuícola frente a la estancación de la pesquera décadas atrás. Asumiendo el objetivo planteado por Naciones Unidas de reducir la explotación pesquera, garantizando pesca sostenible en todos los aspectos (económico, ecológico y social), suma valor a los resultados ofrecidos por el perfil acuícola ya que, ante el futuro crecimiento demográfico, la producción de pescado deberá aumentar un 50% y será irremediamente asumida por éste, acaecido por el agotamiento de recursos y la incapacidad del mar y sus poblaciones por seguir abasteciendo los mercados (APROMAR, 2022).



**Figura 1.** Evolución de la producción acuícola y pesquera mundial en el periodo 1951-2020.  
Fuente: APROMAR, 2022.

Si trasladamos el enfoque productivo del sector acuícola mundial al europeo, según el informe APROMAR de 2022 (Figura 2), España lidera el volumen de producción entre los países miembro con 276.571 toneladas sobre un total de 1.094.315 (datos de 2020), viéndose un descenso con respecto a 2019 de -4,3%. Por otro lado, en lo referente al valor monetario, Francia está en el primer puesto, con una producción correspondiente a 662,7 millones de euros. Tras ella se encuentra España con 525,8 millones, diferencia explicada por la gran y mayor producción de mejillón español, cuyo valor en el mercado es menor que el resto de especies criadas, en su mayoría peces, como la dorada o la lubina.



**Figura 2.** Producción de acuicultura en la Unión Europea por cantidad (toneladas) y valor (millones de euros) en 2020. Fuente: APROMAR, 2022.

Sin embargo, los últimos datos estudiados para España por dicho informe (APROMAR, 2022) hacen referencia al año 2021, estimándose 327.309 toneladas por un valor de 629,0 millones de euros, superando la producción de 2020 en valor y en volumen, reflejado principalmente por el aporte del mejillón (255.303 t), lubina (23.924 t), trucha arcoíris (15.357 t) y dorada (9.632 t).

La alta estima que se tiene por el desarrollo acuícola en España, se explica por las características ambientales y físico-químicas que el país presenta, así como la amplia variedad de recursos hídricos disponibles, asociadas a su riqueza territorial marina y continental, posición geográfica, orografía y diversidad climática. Por otro lado, la presencia de aproximadamente 8.000 km de costa y el gozo de 9 grandes ríos, lagos y ríos menores, dan oportunidad de desarrollo y adaptación, además de satisfacer las necesidades a una gran gama de especies, permitiendo la producción a partir de diferentes métodos y categorizaciones de establecimientos, diferenciando: i) marinos, como viveros, bateas y *long-lines*, ii) terrestres (de agua dulce y salada) y, iii) en zonas de playa, intermareal y esteros. Los datos revelados por el informe APROMAR (2022), hacen referencia a los tomados en el año 2020, por tanto, se puede apreciar notablemente el efecto negativo provocado por el covid-19, reflejado sobre el número



de establecimientos en funcionamiento con respecto al año anterior, 5.102 (160 establecimientos menos que en 2019), siendo la mayor parte de ellos, 4.842, de moluscos. Sin embargo, según las últimas estadísticas ofrecidas por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, el número de establecimiento total en 2021 fue de 5.182, mostrando una pequeña recuperación del sector, en aras de seguir creciendo y desarrollándose, favoreciendo la creación de empleo y la circulación económica.

## **1.2. Hipoxia en acuicultura**

La alta densidad en poblaciones de cultivo piscícolas ha desencadenado problemas asociados a la demanda de oxígeno (Martos-Sitcha et al., 2019). A su vez, el aumento de la temperatura global, propiciada por el cambio climático, ha supuesto una elevación de la temperatura del agua, estando inversamente relacionada con la solubilidad de oxígeno del medio (Verberk et al., 2021). De esta manera, un aumento de temperatura ocasiona una disminución de la solubilidad de los gases y, por tanto, su disponibilidad. Esto ligado al aumento de la población mundial y a la pérdida de conservación de los recursos vivos marinos actualmente sobreexplotados, hará necesaria una mayor producción alimentaria (FAO, 2022) y fomentará el desarrollo de nuevas vías para mantener el estado homeostático de los individuos cultivados en situaciones de estrés, como puede ser una baja concentración de oxígeno en el medio.

Las situaciones de hipoxia actúan como agente estresante, desencadenando una serie de reacciones internas a nivel fisiológico y generando cambios metabólicos. Los efectos de estos cambios internos recaerán sobre el apetito, crecimiento o protección inmunológica, entre otros, dadas las desviaciones energéticas que el organismo realiza para compensar la situación e intentar revertirla, siendo un grave problema para el sector acuícola. Es por ello que se hace necesaria la búsqueda de mantener un equilibrio y control sobre agentes externos estresantes, aminorando efectos negativos y pérdidas económicas (Martos-Sitcha et al., 2020). Sin embargo, el control de estos en medios de cultivo marino supone una mayor complejidad y, por tanto, el reto se hallará en investigar sustancias que aminoren los efectos negativos internos que un agente

estresante pueda ocasionar al animal, en concreto en situaciones de hipoxia (Piazzon et al., 2017; Jerez-Cepa, 2019).

### **1.3. Respuesta fisiológica al estrés**

El estrés puede definirse como “una situación en la cual el equilibrio dinámico de un organismo (estado homeostático) es modificado como consecuencia de la acción de un estímulo intrínseco o extrínseco al animal, denominado agente estresante” (Mancera y Martín, 2014).

Tras romper el equilibrio homeostático, el individuo desencadena una serie de reacciones internas como respuesta para compensar los cambios e intentar adaptarse a ellos. La respuesta fisiológica parte de un estímulo, activando dos sistemas o ejes endocrinos: i) el eje hipotálamo-simpático-cromafín (HSC) y, ii) el eje hipotálamo-hipofisario-interrenal (HHI). La velocidad de activación y de generación de producto final en cada uno de los sistemas es diferente, de modo que el primer eje (HSC) se activa en primera instancia originando un incremento en la síntesis y liberación de catecolaminas por parte de las células cromafines del riñón cefálico, y el segundo (HHI), se activa posteriormente, siendo un proceso más lento y ocasionando la síntesis y liberación de cortisol al plasma (Mancera y Martín, 2014; Jerez-Cepa, 2019). El proceso de respuesta que experimenta un organismo ante una situación de estrés es denominado Síndrome de Adaptación General, definido por Seyle (1950), y viene dado por diferentes etapas en función de la duración del estrés:

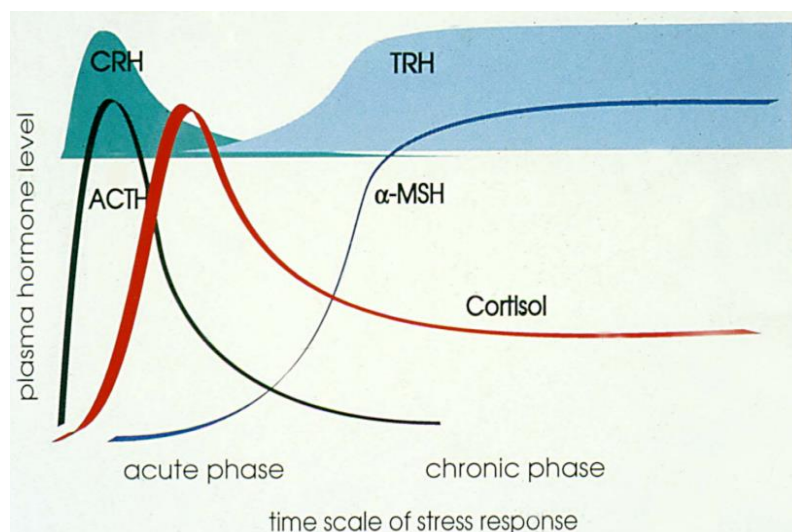
#### **1) Reacción de alarma inicial**

Como su propio nombre indica, se genera una rápida reacción del individuo produciendo la activación del eje HSC, originando la liberación de catecolaminas previamente mencionada: adrenalina por parte del tejido adrenal cromafín y noradrenalina por parte de los terminales nerviosos simpáticos. Entre las funciones y mecanismos que desencadenan estas sustancias, se encuentra un aumento de la actividad motora, ritmo cardíaco y flujo sanguíneo hacia el cerebro, corazón, músculo esquelético y branquias, favoreciendo la captación y transporte de oxígeno. También se produce un aumento de la tasa metabólica basal y metabolismo intermediario,

desencadenando procesos de glucogenolisis (degradación de glucógeno para la obtención de glucosa, energía), lipolisis y glucogénesis (degradación de ácidos grasos para sintetizar glucosa) y proteólisis (degradación de aminoácidos para sintetizar glucosa) (Mancera y Martín, 2014).

## 2) Fase de resistencia

Se produce un intento de adaptación a la situación, activando el eje HHI y retomando niveles normales, aunque superiores, de catecolaminas. Se liberan corticoides adrenales (cortisol) cuya acción es más lenta, manteniendo esta etapa de resistencia energéticamente. Para ello, se genera una cascada endocrina secuenciando una liberación de neuropéptidos desde los centros neuronales del hipotálamo, estimulando la síntesis y liberación de ACTH (Hormona Adrenocorticotropa, estimulada por la hormona liberadora de corticotropina, CRH) y  $\alpha$ -MSH (hormona melanotropa, estimulada por CRH, neuropéptido Y y la hormona liberadora de tirotrina, TRH) en la hipófisis que, a su vez, estimula la síntesis y liberación de cortisol en la glándula interrenal (Mancera y Martín, 2014; Martos-Sitcha, 2014; Jerez-Cepa, 2019) (Figura 3). Igualmente, en esta fase se estimula la síntesis de catecolaminas desde el tejido cromafín por influencia del cortisol y la ACTH, pudiendo mantenerse niveles superiores a los basales (Mancera y Martín, 2014), tal como se ha mencionado previamente. Esta respuesta produce hiperglucemia, aumentando el uso de reservas energéticas.

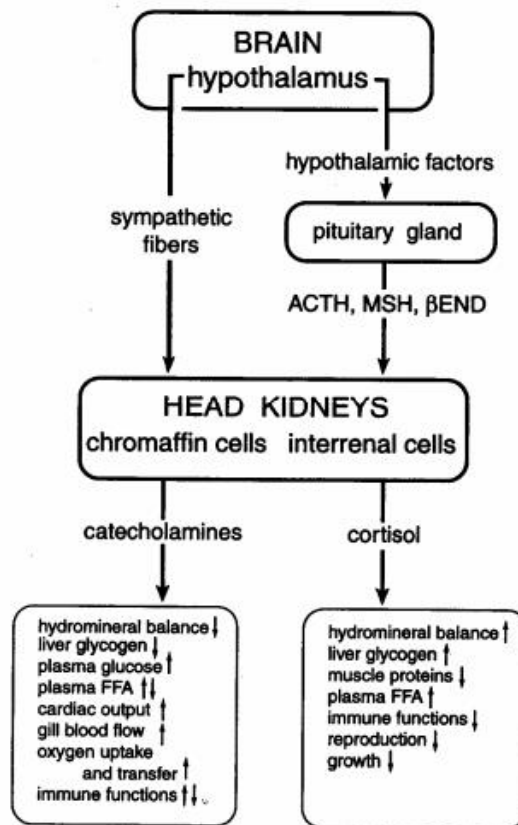


**Figura 3.** Nivel hormonal de CRH, ACTH, TRH,  $\alpha$ -MSH y cortisol en el tiempo, diferenciando fases de estrés agudo (izda.) y crónico (dcha). Fuente: Juan Miguel Mancera

### 3) Fase de agotamiento

El mantenimiento de la situación de estrés y de cortisol en el tiempo, originarán interferencias en otros mecanismos y sistemas fisiológicos como pueden ser el crecimiento, reproducción, sistema inmunitario o resiliencia, pudiendo ocasionar mortalidad del individuo (Mancera y Martín, 2014).

Por tanto, encontramos tres tipos de respuesta (Mancera y Martín, 2014): i) *Respuesta primaria*, donde se produce liberación y aumento de catecolaminas y corticosteroides adrenales en plasma promovidos por la activación de núcleos cerebrales, ii) *Respuesta secundaria*, donde se produce un incremento en el consumo de oxígeno, actividad cardíaca, hiperglucemia y perturbaciones en el balance hidrotermal ocasionado por las alteraciones de catecolaminas y corticosteroides producidas en la respuesta primaria y, iii) *Respuesta terciaria*, donde se activan mecanismos que producen inhibición y perturbación de sistemas fisiológicos (crecimiento, reproducción, sistema inmune y resiliencia) (Mancera y Martín, 2014; Jerez-Cepa, 2019) (Figura 4).



**Figura 4.** Principales elementos neuroendocrinos del sistema de estrés en peces teleosteos y los efectos fisiológicos que conlleva. ACTH: hormona adrenocorticotropa; MSH: hormona estimulante de los melanocitos; β-END: β-endorfina; FFA: ácidos grasos libres; ↑/↓: acción estimuladora/inhibidora (tomado de Wendelaar Bonga, 1997).

#### 1.4. Estrés por hipoxia

La presencia de oxígeno en el medio es un factor ambiental cuya variación puede generar una situación de estrés en los individuos del medio. Existen diferentes clasificaciones de estrés. En este caso, atendiendo al tipo de estrés ambiental, la saturación insuficiente de oxígeno en el medio se trata de un estrés físico.

En condiciones de aguas hipóxicas, se produce la respuesta fisiológica coordinada expuesta previamente, induciendo cambios de comportamiento, fisiológicos y metabólicos. En primera instancia, se produce bradicardia, así como una disminución de la ingesta, reduciendo la demanda de oxígeno y la necesidad de energía (Martos-Sitcha et al., 2019; Speers-Roesch et al., 2009), es decir, se produce una disminución de la tasa metabólica, recayendo sobre el crecimiento y rendimiento productivo.

Por otro lado, se genera un cambio metabólico donde la ausencia o poca presencia de oxígeno propicia la obtención de energía a partir del metabolismo anaerobio. Sin embargo, la eficiencia de esta ruta metabólica es menor, disminuyendo en mayor medida el rendimiento de los peces. La supresión metabólica originada por un estrés prolongado estimula la producción de lactato y la acción catabólica de proteínas a aminoácidos en el músculo blanco que se transportan al hígado para su posterior uso como recurso energético (Shi et al., 2020; Jerez-Cepa, 2019; Maccormack y Driedzic, 2004). Esta respuesta promovida por el cortisol, permitirá emplear dichos recursos en diferentes rutas gluconeogénicas. Por tanto, la influencia del cortisol durante periodos prolongados generará un constante uso de energía no destinado a procesos de crecimiento, reproducción o protección inmune, produciéndose, en definitiva, malgasto energético.

Un proceso de estrés, como puede suceder frente a bajas saturaciones de O<sub>2</sub> en el agua, puede favorecer la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales inducen a un estrés oxidativo (Shi et al., 2020; Magnoni et al., 2017), presenciando radicales libres que deterioran ADN, ARN, proteínas y lípidos, desencadenando reacciones inflamatorias. Esto unido al estrés ya presente, ocasionado por un factor ambiental, desemboca en una depresión del sistema inmune e induce el encuentro con patógenos oportunistas. En última instancia, la cuestión en investigación radica en elementos atenuantes de estrés, es decir, sustancias que sean capaces de regular la liberación y síntesis de cortisol.

### **1.5. Alternativas y mejoras de atenuación de estrés**

La gran relevancia dada en el sector acuícola por mantener el bienestar animal ha promovido el desarrollo de técnicas y estudios que verifiquen el mejor estado y calidad de vida del individuo, como puede ser una óptima densidad de cultivo o niveles de factores físico-químicos (salinidad, temperatura, pH, oxígeno disuelto) que puedan afectar a una especie. Ocasiones donde, tras tener todos los posibles parámetros controlados, el estrés es inmanejable, han generado interés sobre el uso sustancias con acción atenuante, fomentando el desarrollo e investigación de su efecto. Entre estas

sustancias encontramos empleo de anestésicos (de origen natural o químico) y aditivos en la dieta (Jerez-Cepa, 2019). En este estudio se realizará énfasis en los efectos que pueden ocasionar ciertos compuestos adicionados en la dieta.

La vía de entrada facilitada por la ingesta de compuestos nutraceuticos, aislados de deferentes materias primas y demostrados por producir efectos fisiológicos positivos en los organismos, permite una rápida asimilación del mismo, favoreciendo su acción fisiológica. Además, el uso de aditivos con antioxidantes (polifenoles, carotenoides, vitaminas) o que faciliten su absorción, con capacidad estimulante del sistema inmune permiten mantener en mayor medida la resistencia a patógenos oportunistas en situaciones de estrés (Shi et al., 2020; Henrique et al., 1998). Es por ello que se está implementando el uso de fitogénicos y probióticos que favorecen la capacidad antioxidante a través de una mayor absorción y biodisponibilidad de nutrientes (Jerez-Cepa, 2019).

La presencia de componentes bioactivos en macro y microalgas ha fomentado su uso en acuicultura como inmunoestimulantes, con eficientes propiedades antioxidantes y atenuantes de estrés. El estudio publicado por Magnoni et al. (2017) demostró que la suplementación en la dieta con las algas *Gracilaria* y *Ulva* tratadas con calor, mejora la tolerancia a hipoxia aguda en dorada. Así mismo, en otro estudio realizado por Shi et al. (2018) se ha visto el efecto inmune y antioxidante que genera el alga *Sargassum horneri*.

Paralelamente y manteniendo como caso de estudio los efectos dietéticos, es de vital mención la problemática encontrada en la elaboración de piensos, donde casi exentos los recursos naturales marinos procedentes de animales acuáticos para su posterior transformación a harina y aceite de pescado, se han investigado alternativas de sustitución por harinas y aceites de origen vegetal que, ofrecidos a especies carnívoras, como es el caso de la dorada y de la gran mayoría de especies de interés, suponen dificultades para la asimilación de nutrientes que interfieren sobre la eficiencia gastrointestinal, llegando a desencadenar estrés fisiológico (Ekman et al., 2013). Del mismo modo, se ha visto una fuerte relación entre la riqueza de la microbiota intestinal y la barrera de protección frente a reacciones inflamatorias que pueden suponer cualquier proceso de estrés (Cain y Swan, 2010), llegando a mejorar la eficiencia de alimentación de los individuos, así como brindar protección a los mismos. Por tanto,

componentes funcionales añadidos a los piensos traerán grandes beneficios para mantener el estado homeostático de los animales.

## **1.6. Calidad de agua**

El estado ambiental, así como las alteraciones producidas en el mismo, es uno de los factores más relevantes a tener en cuenta en el proceso de proyección, construcción y/o aplicación de un producto, ya sea directo o indirecto su efecto sobre el medio. Por ello, se deberá evaluar previamente la influencia del mismo, pudiendo aportar características beneficiosas o perjudiciales. Desde el inicio del desarrollo acuícola, tomando un papel fundamental sobre la producción y la alimentación, se comenzaron a realizar estudios para analizar y calcular el efecto que supone sobre agua y aire. El estudio realizado en 2020, por MacLeod et al., analizó la proporción de gases de efecto invernadero de origen antropológico que libera el sector acuícola frente al ganadero, siendo de 0,49%, mucho menor que el generado por el vacuno, ovino y caprino. Por otro lado, los vertidos generados por el sector acuícola suelen estar asociados con el incremento de carbono orgánico, sólidos en suspensión, grupos fosfatados y diferentes especies de nitrógeno (en forma de amonio, nitrato y nitrito), así como demanda de oxígeno químico y biológico, provenientes de residuos de la actividad como pueden ser restos de pienso, heces o descomposición de algún individuo que genere sedimentación, fomentando la contaminación del agua e impactando sobre los niveles de oxígeno disuelto y la supervivencia de los propios individuos (Hlordzi et al., 2020)

Mantener la calidad del agua en un área de cría es uno de los grandes retos que rigen al sector, debido a que el deterioro del medio está directamente relacionado con el bienestar animal. Así mismo, las altas densidades de cultivo pueden provocar éste empobrecimiento del medio, generando estrés y haciendo más susceptibles a enfermedades o patógenos a los individuos (Lieke et al., 2019). Sistemas de recirculación o tecnologías de biofiltros (donde se incluye el uso de microorganismos y sistemas de acuaponía) son diferentes métodos probados para amortiguar o aminorar los efectos sobre el medio (Carlberg et al., 2002; Hlordzi et al., 2020), aunque uno de los métodos más usados es la renovación de agua, el cual es caro y puede acarrear las consecuencias

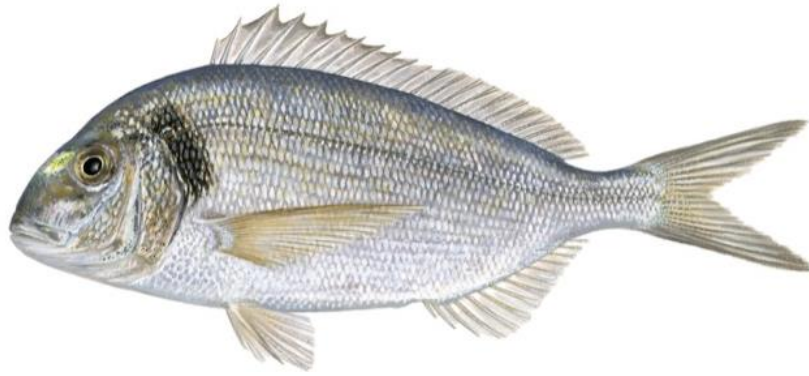


de infección y liberación de residuos al medio. Por otro lado, se ha estado implementando el uso de probióticos para el mantenimiento de la calidad del agua, además de promover a los individuos inmunestimulación, resistencia a patógenos y mejoras sobre el rendimiento energético y crecimiento (Hoseinifar et al., 2018).

De esta forma, la inclusión de probióticos en la dieta generará cambios fisiológicos a los individuos, así como efectos al medio por la liberación de heces. Si los cambios fisiológicos van direccionados a mejorar la eficiencia de alimentación, de manera que exista una mayor digestibilidad y aprovechamiento nutricional, se generará menor residuo y menor liberación de gases nitrogenados provenientes del metabolismo proteico. Por otro lado, se ha visto como grupos bacterianos específicos como *Bacillus sp.*, han demostrado tener propiedades depurativas sobre el medio acuático además de producir una serie de esporas y metabolitos que confieren protección frente a patógenos al individuo. Por tanto, adiciones específicas de probióticos en piensos pueden beneficiar positivamente tanto al individuo como al medio (Hlordzi et al., 2020).

### **1.7. La dorada como especie de interés**

La dorada (*Sparus aurata* Linneaus, 1758), es una especie de teleósteo marino perteneciente a la clase Osteictios, orden Perciformes y familia *Sparidae*, caracterizada por su cuerpo alto ovalado y dorsalmente aplanado, con cabeza grande y perfil arqueado. Presenta una coloración argétea y destaca por su brillante mancha dorada entre los ojos y, por la vertical negra en su zona opercular, que arranca desde la línea lateral hacia la parte superior de los opérculos branquiales (Figura 5). La especie se extiende por el Mar Mediterráneo, Mar Negro, Mar Rojo y las costas orientales del Atlántico, además de las costas inglesas y mauritanas (Calderer, 2001).



**Figura 5.** *Sparus aurata* Linnaeus, 1758. Fuente: *Scandinavian Fishing Year Book*.

Habita en profundidades de hasta 90 metros, por lo común en zonas litorales y puede llegar a alcanzar los 70 cm de longitud, peso de 5 kg y 10 años de vida (Calderer, 2001). Se trata de una especie euriterma (5-32 °C) y eurihalina (4-70‰) que, durante los meses de primavera y verano, habitan en zonas costeras y salobres (desembocaduras de ríos y lagunas litorales) alevines y juveniles para alimentarse. Al avanzar el ciclo anual y llegar los meses de otoño, realizan una migración a mar abierto, en especial los individuos con edad de madurez sexual, para la reproducción y el desove (Hadj-Taieb et al., 2013). La adaptación a amplios rangos de temperatura y salinidad ha generado en esta especie alto interés para su producción, promoviendo su estudio ante condiciones de estrés semejantes a la realidad de cultivo (Jerez-Cepa, 2019).

La dorada presenta hermafroditismo secuencial protándrico, en donde los individuos al nacer son machos y tras producirse la primera madurez sexual, en función de las condiciones ambientales, así como factores sociales y hormonales, se produce la inversión sexual de una proporción de la población a hembra (Calderer, 2001). La alimentación biológica de la especie es carnívora, siendo las necesidades proteicas elevadas e imprescindibles los aportes correspondientes de ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales para el mantenimiento del estado homeostático (Fernández-Palacios, 2007).

Al ser una especie de alto interés, se ve reflejada su importancia en la producción anual tanto mediterránea como europea y española. En 2021 se estimaron 321.912 toneladas producidas en Europa y en el resto del Mediterráneo por acuicultura, un 12,6% superior al año anterior (APROMAR, 2022). España representa el 3% de la

producción con 9.632 toneladas, igualmente superando las cifras del año anterior en un 46,2%, mostrando una recuperación de la producción afectada por la pandemia sufrida en 2020. La Comunidad Valenciana encabeza la producción con en 57% del total, 5.486 toneladas. Cabe destacar que, a nivel mundial, el 97% de la oferta total de dorada corresponde a acuicultura, frente al 3% que supone la pesca extractiva.

## 1.8. Objetivos

El **objetivo general** del Trabajo Fin de Máster será evaluar, a partir de un experimento de alimentación a medio-largo plazo, el efecto ocasionado por la suplementación de diferentes concentraciones (1 y 3,5 %) de un nutracéutico simbiótico natural a base de hidrolizados de macroalgas, alginato y extracciones enzimático-bacterianas desarrollado por la empresa Biotechnology Biopolym S.A. (*Prebiodo II*), en dietas con alta proporción de harinas vegetales sobre juveniles de dorada (*Sparus aurata*) sometidos a un reto de hipoxia moderada. Para ello, el proceso será desarrollado en los siguientes **objetivos específicos**:

- Analizar cambios metabólicos producidos a nivel circulante (plasma), hepático y muscular en ejemplares mantenidos bajo condiciones de i) normoxia (saturación de oxígeno >85%) e ii) hipoxia moderada (saturación de oxígeno 35-40%), previamente alimentados durante un periodo de 90 días con diferentes dosis del compuesto *Prebiodo II*.
- Examinar la calidad del agua mediante las diferencias encontradas en las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato liberadas al medio en condiciones de normoxia e hipoxia moderada.
- Evaluar posibles mejoras metabólicas y de bienestar durante el proceso de hipoxia moderada, asociadas a una mayor digestibilidad y funcionalidad del compuesto *Prebiodo II*.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Diseño experimental

En base a la relevancia y alto interés productivo enfocado sobre el sector acuícola, especialmente en la dorada (*Sparus aurata*), se propuso estudiar el efecto ocasionado por la suplementación de un nutraceutico simbiótico natural a base de hidrolizados de macroalgas, alginato y extracciones enzimático-bacterianas (*Prebiodo II* producido por *Biotechnology Biopolym S.A.*) en dietas con alta proporción de origen vegetal (~75%) sobre juveniles de dorada, sometidas a una disminución de la concentración/saturación de oxígeno (O<sub>2</sub>) del medio. El estudio surgió a partir de un experimento inicial de alimentación a medio-largo plazo (91 días), el cual permitió estudiar en primera instancia el efecto provocado por la dieta suplementada con el nutraceutico natural (*Prebiodo II*) sobre el crecimiento, metabolismo intermediario y bienestar animal en los juveniles de dorada (Moreno, 2022). Tras ello, se propuso estudiar el efecto de la suplementación asociado a estrés ambiental (medio hipóxico).

El experimento fue realizado en los Servicios Centrales de Investigación en Cultivos Marinos (SCI-CM) de la Universidad de Cádiz (CASEM, Puerto Real; Código REGA ES11028000312).

Partiendo del experimento de alimentación y crecimiento, se estabularon un total de 180 individuos con un peso medio inicial de  $54,58 \pm 0,05$  g en 9 tanques con volumen de 300 L (20 individuos/tanque; densidad de carga inicial de 3 kg/m<sup>3</sup>). Se establecieron 3 grupos experimentales, en triplicado, en función de la dieta ofrecida: i) Dieta control con alta proporción vegetal (control), ii) suplementación con un porcentaje de inclusión al 1% de *Prebiodo II* sobre la dieta control (B 1%), y iii) suplementación con un porcentaje de inclusión al 3,5% de *Prebiodo II* sobre la dieta control (B 3,5%). Las condiciones ambientales fueron de 19°C y 37‰ de salinidad, con un sistema de flujo abierto y constante, y periodo natural asistido (13L/11D) durante un periodo experimental de 91 días. La alimentación se realizó durante 6 días a la semana, ofreciendo dos tomas diarias hasta saciedad aparente (*ad libitum*), manteniendo un control semanal de ingesta gravimétricamente y, un control mensual de crecimiento a partir de muestreos biométricos. La prueba de alimentación se llevó a cabo “a ciegas” y la distribución de los individuos bajo condición de aleatoriedad, significando esto el desconocimiento de la

dieta asignada a cada grupo experimental hasta la finalización del proceso de experimentación, evitando subjetividad sobre posibles cambios visuales y conductuales. La identificación de cada grupo fue marcada mediante colores: i) rojo para el control, ii) verde para la suplementación de 1% y, iii) azul para la suplementación de 3,5%.

Posteriormente, tras 7 días adicionales de alimentación una vez finalizado el muestreo final de crecimiento, un total de 126 individuos, repartidos en los 9 tanques mencionados previamente, y bajo su misma organización, fueron sometidos a hipoxia moderada dos de cada tres tanques por grupo experimental, durante un periodo de 24 horas. Es decir, en base a la dieta, se establecieron dos subgrupos: normoxia (>85 % saturación de O<sub>2</sub>) e hipoxia moderada (35-40 % saturación de O<sub>2</sub>), obteniendo dos variables a analizar posteriormente, en función de: i) la suplementación de la dieta y, ii) de la concentración/saturación de oxígeno en el medio.

## **2.2. Obtención de datos biométricos y muestras biológicas**

La fase de experimentación condicionada por los niveles de O<sub>2</sub> concluyó con un muestreo final que permitió el posterior análisis de datos. Así, tras 24 h de hipoxia moderada, y previo a la extracción de los peces de cada uno de los tanques, se tomó una alícuota de agua para la medición de parámetros de calidad. Posteriormente, 4-6 individuos por tanque (n = 6-8 individuos/grupo experimental) fueron anestesiados a dosis letal (1 mL de 2-fenoxietanol/L agua de mar) para la toma de muestras biológicas. Los individuos fueron pesados y medidos individualmente permitiendo realizar el cálculo del factor de condición (K). Se prosiguió con la obtención de sangre por punción del pedúnculo caudal mediante jeringas de 1 mL previamente heparinizadas, evitando la coagulación sanguínea, y su centrifugación durante 3 minutos a 13.000 g para la diferenciación de hematocrito y plasma. El plasma fue doblemente alicuotado en tubos Eppendorf de 0,5 mL para el futuro análisis metabólico.

Seguidamente, a través de una incisión desde el ano a la zona opercular inferior, se extrajo el paquete visceral y se separaron los diferentes órganos. El hígado fue pesado para el cálculo de índice hepatosomático (IHS), así como alicuotado para el análisis metabólico. La toma de muestras concluyó con la muscular, mediante un pequeño corte

de la zona dorsal del animal, previamente desescamado y sin piel, para ser igualmente alicuotado y analizado. Las muestras biológicas fueron instantáneamente congeladas en nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas a -80°C hasta su análisis.

Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo siguiendo las directrices dadas por la legislación vigente de la Unión Europea (2010/63/UE), española (ley 32/2007 y RD 53/2013) y de la Universidad de Cádiz, para el uso de animales de laboratorio. Además, el presente modelo experimental cuenta con la aprobación de la Junta de Andalucía para el uso y manipulación de animales de experimentación, con el número de autorización 3/11/2021/172.

### 2.3. Índices zootécnicos y somáticos

Los datos obtenidos en relación a las medidas de los individuos, como son el peso y la longitud furcal, permitieron calcular el índice zootécnico factor de condición (K). Por otro lado, el peso tomado del hígado permitió hallar el índice hepatosomático (IHS). Las expresiones para cada uno de los índices vienen dadas por:

- K: relación volumétrica en función del peso.

$$K = \frac{\text{Peso individual (g)}}{\text{Longitud individual}^3(\text{cm})} \cdot 100$$

- IHS (%): Relación existente entre el peso del hígado y el peso total del ejemplar. Permite conocer la reserva energética del animal a nivel hepático.

$$IHS = \frac{\text{Peso}_{\text{Higado}}(\text{g})}{\text{Peso individual}(\text{g})} \cdot 100$$

### 2.4. Análisis metabólico

Las técnicas de análisis metabólico usadas están basadas en reacciones colorimétricas entre la muestra y una solución reactiva, generando un producto final el cual, en función de su absorbancia y la comparación con curvas estándar preparadas para cada uno de los metabolitos, permitirá conocer la concentración del metabolito en cuestión. Las soluciones reactivas fueron facilitadas por kits de las casas comerciales: i)

SpinReact S.A., Sant Esteve d'en Bas, Girona, España, para el caso de los metabolitos energéticos (lactato [Lactate Ref. 1001330], glucosa [Glucose-HK Cod. 1001200], triglicéridos [Triglycerides Ref. 1001311] y colesterol [Cholesterol-LQ Ref. 41021]); ii) THERMO, PIERCE™ BCA, CULTEK S.L., Rockford, EE.UU., para el caso de las proteínas totales (BCA *Protein Assay Kit*); y iii) Arbor Assays™, Eisenhower Place Ann Arbor, EE.UU., para el caso del cortisol plasmático (Cortisol Enzyme Immunoassay, K003-H1W). Las muestras fueron preparadas en microplacas de 96 pocillos, y analizadas en un espectrofotómetro PowerWave™ 340 para microplaca (Biotek Instruments, Winooski, VT, EE.UU.), con software analítico KCjunior Software para Microsoft® Windows XP (Figura 6). Las muestras fueron analizadas en duplicado, con curvas de calibrado en cuadruplicado. Para el análisis de lactato, triglicéridos, colesterol y proteína las muestras fueron necesariamente diluidas, cuya especificación se redacta a continuación.

El proceso de análisis metabólico comenzó con las muestras plasmáticas, en las cuales se estudiaron los niveles de glucosa, lactato (1/4), triglicéridos (1/4), colesterol (1/4), proteína (1/50) y cortisol. En segundo lugar, se analizaron las muestras hepáticas, donde se vieron los niveles de lactato (1/15), triglicéridos (1/60), glucosa y glucógeno (1/315). Finalizando el análisis metabólico con el muscular, midiendo los niveles de lactato (1/60), triglicéridos (1/15), glucosa y glucógeno (1/315).



**Figura 6.** Espectrofotómetro PowerWave. Fuente: Biotek

## **2.5. Análisis de agua**

El reto de hipoxia requirió la eliminación prácticamente total de la aireación de cada uno de los tanques, con una disminución mínima del flujo de agua de entrada, de modo que, la renovación de agua fue menor, con búsqueda de similitud a un caso real de cultivo, donde se encuentra en mayor medida el proceso de nitrificación. Las muestras de agua (12 mL) se tomaron en el momento de muestreo para ser directamente congeladas a -20 °C. El análisis de las mismas se realizó con el kit comercial de Hanna Instruments® (HI 700 Amonio Rango Bajo y HI 764 Nitrito Rango Ultra Bajo), previa dilución de las muestras ½ para la obtención de la concentración de amonio y nitritos (ppm) en el agua.

## **2.6. Análisis estadístico**

Los datos y parámetros obtenidos en las técnicas analíticas fueron trabajados y ordenados mediante el software Microsoft Excel permitiendo el cálculo de índices zootécnicos, somáticos y niveles metabólicos para su posterior procesamiento en el programa estadístico GraphPad Prism 8 (GraphPad Softwares, San Diego, EE.UU.) Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) para la ejecución analítica mediante un análisis de varianza de dos vías (two-way ANOVA). Las variables consideradas fueron i) la dieta experimental de cada grupo (control, B 1% y B 3,5%) y ii) la concentración/saturación de oxígeno en el medio (normoxia e hipoxia). Se aplicaron test estadísticos de normalidad y homocedasticidad para la comparación de varianzas entre los grupos. Las diferencias significativas son expresadas con valores de significación de  $p$ -valor $<0,05$ , e identificadas mediante el test de Tukey.



### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Crecimiento y parámetros biométricos**

En relación al experimento de crecimiento realizado durante 91 días de alimentación, los individuos experimentales partieron de un peso inicial de  $54,58 \pm 0,05$  g, alcanzando un peso final aproximado en todos los grupos de entre 130-134 g, obteniendo el mayor valor en cuanto a biomasa, ganancia de peso (WG, evolución del peso en porcentaje) y tasa específica de crecimiento (SGR, variación del peso a lo largo del tiempo) para el grupo B 1%; además, se encontraron valores estadísticamente significativos en la eficiencia de alimentación (FE, relación entre el aumento de peso y alimento ingerido), mostrando una clara y observable tendencia creciente y dosis-dependiente (Moreno, 2022).

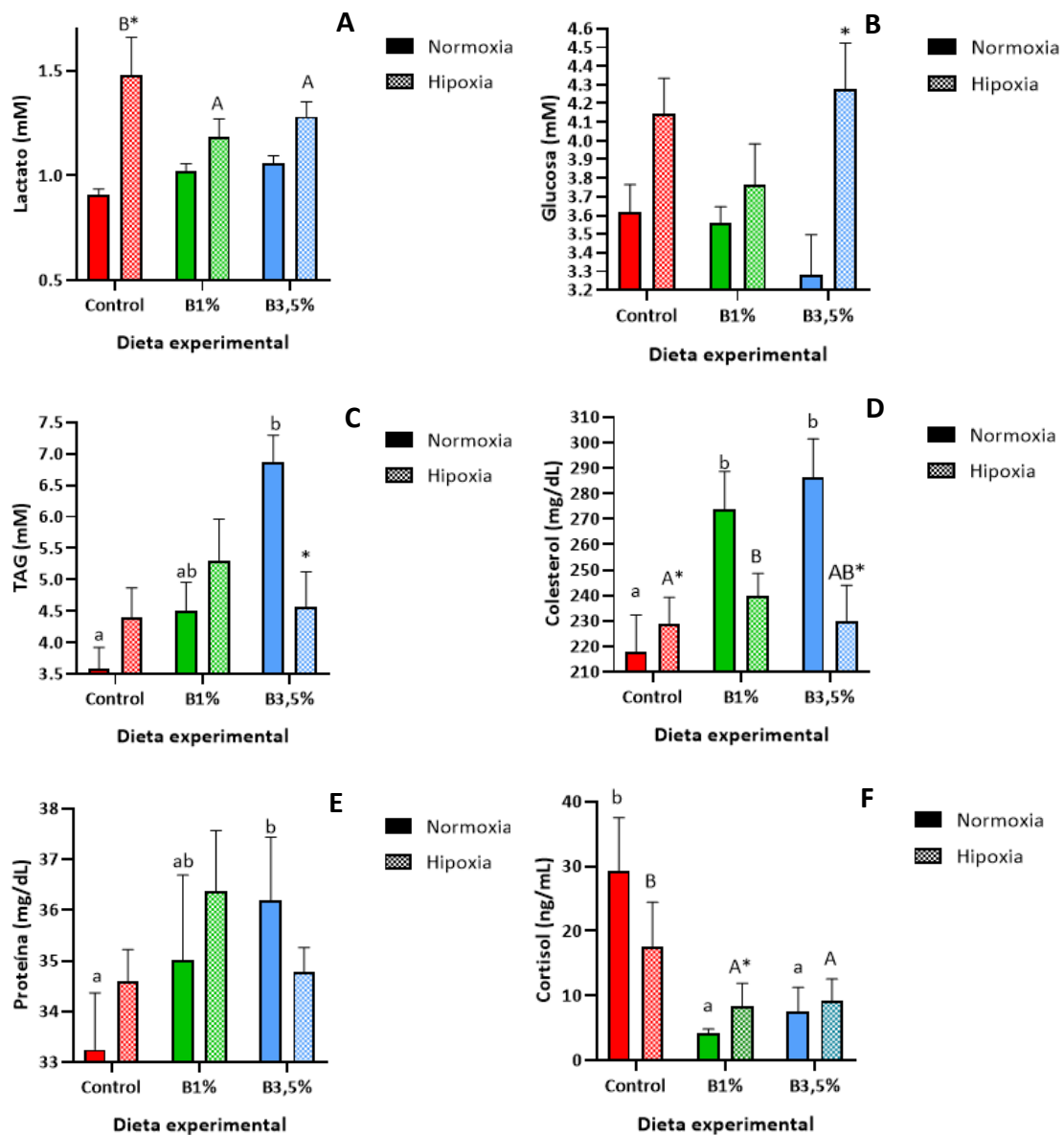
Los resultados referentes al factor de condición (K) e índice hepatosomático (IHS, %) se muestran en la Tabla 1. El factor K muestra valores estadísticamente significativos ( $p$ -valor $<0,05$ ) en cuanto a la dieta en ambos grupos (normoxia e hipoxia), mostrando los valores más altos en el grupo suplementado al 1% (B 1%). El índice hepatosomático (IHS, %) fue menor en los grupos suplementados (B 1% y B 3,5%) mostrando una tendencia decreciente y dosis-dependiente, no siendo estadísticamente significativo y correspondiéndose con resultados anteriormente obtenidos (Moreno, 2022).

**Tabla 1.** Resultados de factor de condición (K) e índice hepatosomático (IHS, %) en juveniles de *Sparus aurata* alimentados con diferentes dietas experimentales (Control, B 1% y B 3,5%) y sometidos a diferentes concentraciones/saturaciones de oxígeno (normoxia e hipoxia). Resultados expresados como el promedio  $\pm$  EEM, y analizados mediante análisis ANOVA de dos vías. Las diferentes letras minúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo normoxia. Las diferentes letras mayúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo hipoxia ( $p$ -valor $<0,05$ ).

	Control		B 1%		B 3,5%		p-valor		
	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Dieta	[O <sub>2</sub> ]	Interacción
K	2,11 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	2,20 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	2,27 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	2,33 $\pm$ 0,05 <sup>B</sup>	2,15 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	2,30 $\pm$ 0,07 <sup>AB</sup>	0,024	0,518	0,475
IHS (%)	2,02 $\pm$ 0,11	1,86 $\pm$ 0,14	1,92 $\pm$ 0,11	1,63 $\pm$ 0,14	1,60 $\pm$ 0,06	1,74 $\pm$ 0,12	0,591	0,591	0,523

### 3.2. Metabolitos plasmáticos

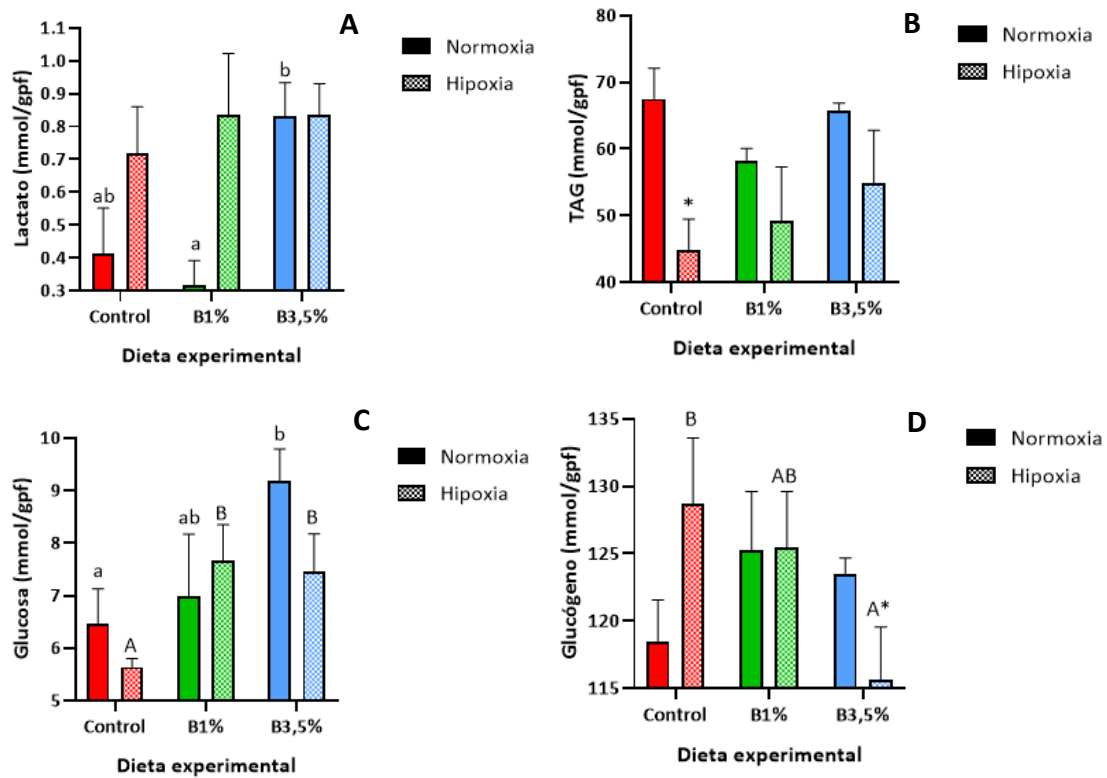
Los resultados de metabolitos plasmáticos (lactato, glucosa, triglicéridos, colesterol y proteínas), así como de los niveles circulantes de cortisol, se muestran en la Figura 7. Los niveles de lactato (mM) mostraron una disminución estadísticamente significativa en los grupos alimentados con ambas concentraciones (1 y 3,5%) de *Prebiodo II* con respecto al grupo Control en aquellos animales mantenidos en condiciones de hipoxia moderada; además, el proceso de hipoxia mostró un aumento de los niveles de este metabolito con respecto a los registrados en animales en normoxia, siendo estadísticamente significativos el grupo Control (Fig. 7A). Los valores de glucosa también (mM) aumentaron de forma general en los grupos sometidos a hipoxia, encontrando una mayor respuesta en el grupo B 3,5% con un aumento significativo con respecto a los animales mantenidos en condiciones de normoxia (Fig. 7B). En el caso de los triglicéridos (TAG, mM; Fig. 7C) y proteínas (mg/dL; Fig. 7E) se observó un aumento significativo y dosis-dependiente en función de la dieta para los grupos en normoxia. Por su parte, la comparación entre los grupos mantenidos en normoxia e hipoxia solo mostró una disminución de los valores de ambos metabolitos en los animales alimentados previamente con la dieta B 3,5%, aunque siendo solo estadísticamente significativa para el caso de los TAG (Fig. 7C). En cuanto a los niveles de colesterol (mg/dL; Fig. 7D), la suplementación con ambas concentraciones de *Prebiodo II* reflejó valores crecientes en ambas condiciones de saturación de oxígeno (normoxia e hipoxia), con un aumento significativo para el grupo Control, y una disminución generalizada en los grupos B 1% y B 3,5% para los ejemplares sometidos al proceso de hipoxia moderada con respecto a los mantenidos en condiciones de normoxia. Finalmente, los niveles de cortisol circulante (ng/dL) se muestran en la Fig. 7F. Los resultados mostraron una disminución generalizada y significativa en los grupos suplementados con el producto *Prebiodo II* (B 1% y B 3,5%) con respecto al grupo Control en ambas condiciones de saturación de oxígeno. Por lo que se refiere a los grupos sometidos a hipoxia, solo los ejemplares suplementados al B 1% mostraron un aumento significativo con respecto a los que se encontraban en condiciones de normoxia, mientras que para el grupo Control la hipoxia mostró una disminución, aunque no significativa, de esta hormona.



**Figura 7.** Niveles de metabolitos plasmáticos [A: Lactato (Mm), B: Glucosa (Mm), C: Triglicéridos (TAG, Mm), D: Colesterol (mg/dL), E: Proteínas (mg/dL)] y F: Cortisol (ng/dL) en juveniles de *Sparus aurata* alimentados con diferentes dietas experimentales (Control, B 1% y B 3,5%) y sometidos a diferentes concentraciones/saturaciones de oxígeno (normoxia e hipoxia). Resultados expresados como el promedio  $\pm$  EEM, y analizados mediante análisis ANOVA de dos vías. Las diferentes letras minúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo normoxia. Las diferentes letras mayúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo hipoxia. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas entre diferentes saturaciones de oxígeno dentro de una misma dieta ( $p$ -valor $<0,05$ ).

### 3.3. Metabolitos hepáticos

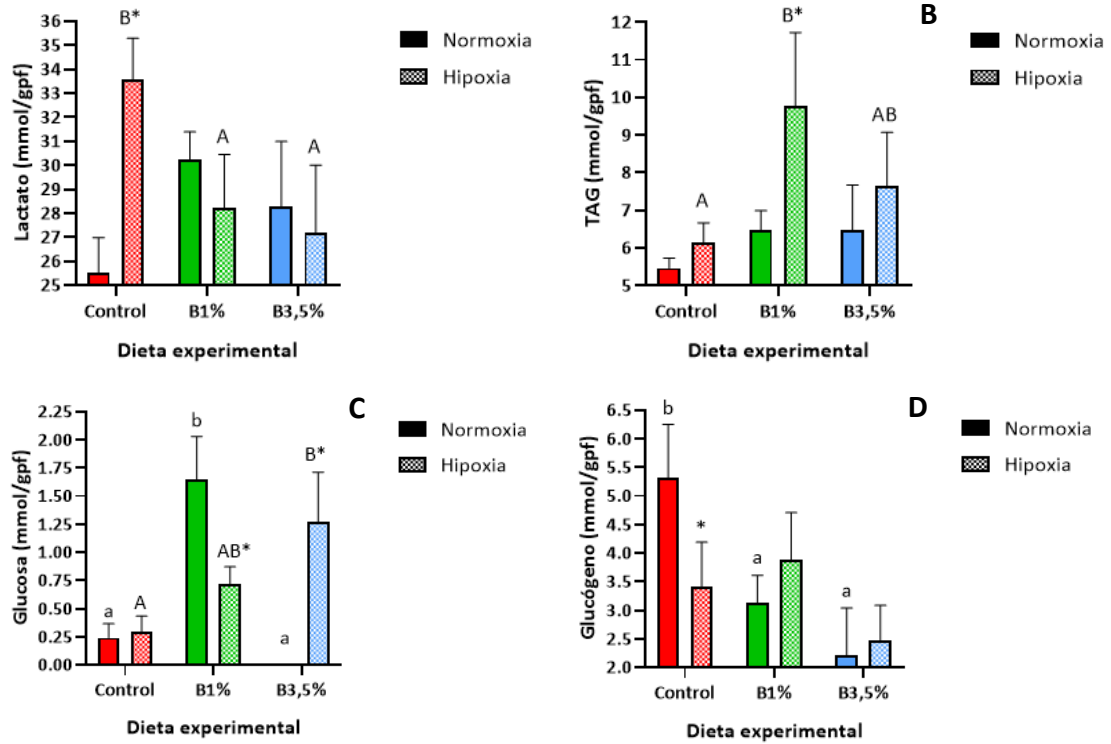
Los resultados de metabolitos hepáticos (lactato, triglicéridos, glucosa y glucógeno) se muestran representados en la Figura 8. Los niveles de lactato (mmol/g peso fresco) mostraron un aumento generalizado, aunque no estadísticamente significativo, en los individuos sometidos a hipoxia, encontrando mayor diferencia en los grupos Control y B 3,5%. Por otro lado, se encontró significancia en cuanto a la dieta en los ejemplares mantenidos en condiciones de normoxia, mostrando mayores niveles de este metabolito los suplementados con *Prebiodo II* al 3,5% (Fig. 8A). Sin embargo, los niveles de triglicéridos (TAG, mmol/g peso fresco) fueron menores de manera general en los grupos sometidos a hipoxia moderada, siendo esta disminución significativa para el grupo Control cuando se comparan con los ejemplares mantenidos en condiciones de normoxia. Además, se pudo apreciar una tendencia creciente y dosis-dependiente en los ejemplares mantenidos en hipoxia moderada (Fig. 8B). Los niveles de glucosa (mmol/g peso fresco) reflejaron una tendencia creciente y dosis-dependiente en normoxia, siendo significativamente mayores para el grupo suplementado al 3,5% frente al Control, mientras que, en condiciones de hipoxia, los resultados muestran valores significativamente mayores para ambos grupos suplementados con *Prebiodo II* respecto al Control. En último lugar, los resultados referentes al nivel de glucógeno (mmol/g peso fresco) mostraron un patrón con la disminución dosis-dependiente y estadísticamente significativa en aquellos individuos sometidos a hipoxia moderada. A su vez, el proceso de hipoxia mostró una disminución estadísticamente significativa de este metabolito con respecto a los valores obtenidos en normoxia para el grupo suplementado al 3,5% (Fig. 8D).



**Figura 8.** Niveles de metabolitos hepáticos [A: Lactato (mmol/gpf), B: Triglicéridos (TAG, mmol/gpf), C: Glucosa (mmol/gpf) y D: Glucógeno (mmol/gpf)] en juveniles de *Sparus aurata* alimentados con diferentes dietas experimentales (Control, B 1% y B 3,5%) y sometidos a diferentes concentraciones/saturaciones de oxígeno (normoxia e hipoxia). Resultados expresados como el promedio  $\pm$  EEM, y analizados mediante análisis ANOVA de dos vías. Las diferentes letras minúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo normoxia. Las diferentes letras mayúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo hipoxia. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas entre diferentes saturaciones de oxígeno dentro de una misma dieta ( $p$ -valor $<$ 0,05).

### 3.4. Metabolitos musculares

Los resultados de metabolitos musculares (lactato, triglicéridos, glucosa y glucógeno) se muestran en la Figura 9. Los niveles de lactato (mmol/g peso fresco) en condiciones de hipoxia mostraron una disminución estadísticamente significativa con tendencia dosis-dependiente entre los grupos alimentados con dieta suplementada al 1% y 3,5% de *Prebiodo II* y el grupo Control. A su vez, para el grupo Control el proceso de hipoxia generó un aumento significativo de los niveles de este metabolito con respecto a los registrados en animales en normoxia (Fig. 9A). Los niveles de triglicéridos (TAG, mmol/g peso fresco) mostraron una mayor concentración en ambos grupos suplementados con *Prebiodo II* en los animales sometidos a hipoxia, siendo estadísticamente significativo para el grupo B 1% respecto al Control; además este grupo presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores obtenidos en normoxia (Fig. 9B). Los niveles de glucosa (mmol/g peso fresco) de los ejemplares mantenidos en condiciones de hipoxia moderada presentaron un aumento estadísticamente significativo entre el grupo suplementado al 3,5% y el grupo Control, mostrando una tendencia creciente y dosis-dependiente, mientras que en el caso de los individuos mantenidos en normoxia se observó un aumento de este parámetro en los alimentados con el 1% del compuesto, presentando los del grupo Control y B 3,5% valores prácticamente indetectables; por su parte, el efecto de la hipoxia generó efectos significativos sobre ambos grupos suplementados (B 1% y B 3,5%), mostrando un descenso en el primero y aumento en el segundo, respectivamente, con respecto a la normoxia (Fig. 9C). Finalmente, los niveles de glucógeno (mmol/g peso fresco) se muestran en la Figura 9D. Los resultados mostraron una tendencia decreciente y dosis-dependiente en el grupo sometido a hipoxia, siendo significativa la diferencia entre los grupos suplementados (B 1% y B 3,5%) con respecto al Control. Además, se puede observar un mayor efecto de la hipoxia en los individuos alimentados con la dieta Control, encontrando una disminución estadísticamente significativa con respecto a los valores obtenidos de este metabolito en normoxia.

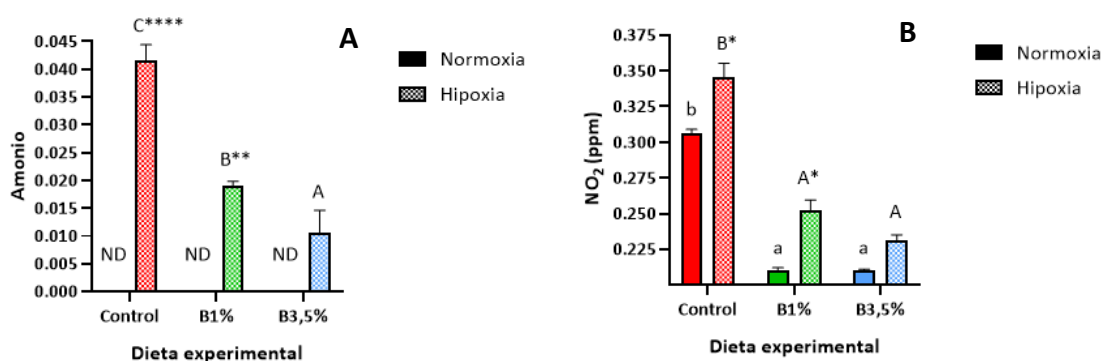


**Figura 9.** Niveles de metabolitos musculares [A: Lactato (mmol/gpf), B: Triglicéridos (TAG, mmol/gpf), C: Glucosa (mmol/gpf) y D: Glucógeno (mmol/gpf)] en juveniles de *Sparus aurata* alimentados con diferentes dietas experimentales (Control, B 1% y B 3,5%) y sometidos a diferentes concentraciones/saturaciones de oxígeno (normoxia e hipoxia). Resultados expresados como el promedio  $\pm$  EEM, y analizados mediante análisis ANOVA de dos vías. Las diferentes letras minúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo normoxia. Las diferentes letras mayúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo hipoxia. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas entre diferentes saturaciones de oxígeno dentro de una misma dieta ( $p$ -valor $<$ 0,05).



### 3.5. Calidad de agua

Los resultados analizados para el estudio de calidad de agua (pH, amonio y nitrito) se muestran en la Figura 10. Los niveles de amonio ( $\text{NH}_4$ , ppm) en agua en aquellos tanques mantenidos en normoxia revelaron unas concentraciones indetectables, mientras que en aquellos tanques mantenidos en hipoxia mostraron una tendencia decreciente y estadísticamente significativa entre grupos, mostrando el grupo control los mayores niveles, con una clara disminución de este parámetro de forma dosis-dependiente. Además, el proceso de hipoxia generó un aumento significativo con respecto a los valores registrados en normoxia para el grupo Control y el suplementado al 1% de *Prebiodo II* (Fig 10A). Por otro lado, los niveles de nitrito ( $\text{NO}_2$ , ppm) mostraron un patrón similar en ambas condiciones de normoxia e hipoxia, con una tendencia decreciente y estadísticamente significativa entre el grupo Control y los grupos suplementados (B1% y B3,5%). Además, y de manera general, se produjo un aumento de este parámetro en el agua de los grupos sometidos a hipoxia, aunque estas diferencias solo fueron estadísticamente significativas para los tanques del grupo Control y en aquel suplementado al 1% de *Prebiodo II* (Fig. 10B).



**Figura 10.** Niveles en agua de **A:** Amonio ( $\text{NH}_4$ , ppm) y **B:** Nitrito ( $\text{NO}_2$ , ppm) en el medio donde juveniles de *Sparus aurata* fueron alimentados con diferentes dietas experimentales (Control, B 1% y B 3,5%) y sometidos a diferentes concentraciones/saturaciones de oxígeno (normoxia e hipoxia). Resultados expresados como el promedio  $\pm$  EEM, y analizados mediante análisis ANOVA de dos vías. Las diferentes letras minúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo normoxia. Las diferentes letras mayúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo hipoxia. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas entre diferentes saturaciones de oxígeno dentro de una misma dieta ( $p$ -valor < 0,05; ND: No Detectado).

#### 4. DISCUSIÓN

Encontrar componentes dietéticos provistos de propiedades beneficiosas y necesarias para mantener y/o fortalecer el estado homeostático de los individuos productivos ha sido uno de los objetivos principales a seguir en el sector acuícola. Los numerosos agentes externos considerados estresantes que coexisten continuamente con los cultivos están siendo punto de mira en investigación para poder ser capaces de encontrar sustancias atenuantes de estrés que dichos agentes producen sobre los individuos (Cerezuela, 2012). Por otro lado, la insistencia en formular dietas adecuadas a una especie en concreto nace de la necesidad de lograr la optimización en el rendimiento técnico productivo y económico manteniendo, a su vez, sostenibilidad y bienestar animal en el cultivo. De manera que, cumplir las necesidades fisiológicas ligadas a la alimentación tendrá un valor real sobre las capacidades que desarrollará el individuo para poder mantenerse en el estado ideal (homeostático), brindándole de la energía suficiente y adecuada para lograr las metas de crecimiento y productividad establecidas. En el presente Trabajo Fin de Máster se evaluó el efecto que ocasionó un nutraceutico simbiótico natural, a base de macroalgas, alginato y extracciones enzimático-bacterianas (*Prebiodo II* desarrollado por *Biotechnology Biopolym S.A.*), adicionado a una dieta con alto porcentaje de origen vegetal, sobre juveniles de dorada sometidos tras un periodo de alimentación a medio/largo plazo (91 días) a un reto de hipoxia moderada, considerada esta como fuente de estrés.

Los parámetros de crecimiento estudiados tras el periodo de alimentación dieron una posible idea del estado interno en el que se encontraban los ejemplares. El factor de condición (K) responde al tipo de crecimiento seguido por los individuos en relación a la proporción entre el aumento de peso y longitud, oscilando entre 1,5 y 2,5 en dorada (Ortega, 2008) por lo que, aun habiendo encontrado los mayores valores de este parámetro en los individuos suplementados con *Prebiodo II* al 1%, con valores de 2,27 en normoxia y 2,33 en hipoxia, se puede confirmar el buen estado o condición de los ejemplares en general, siguiendo un correcto crecimiento alométrico entre todas las dietas experimentales. Además de ello, llama la atención las diferencias observadas, aunque no significativas, dentro de cada dieta dependientes de la condición de oxígeno mantenida durante las últimas 24 h de cultivo (periodo de hipoxia vs normoxia). En este

sentido, cabe recordar que el proceso de hipoxia se inició tras la alimentación de todos los animales en condiciones de normoxia, por lo que estas tendencias de aumento del parámetro K (peso corporal/longitud<sup>3</sup>) pueden reflejar claramente la disminución metabólica de los animales provocada durante el periodo de hipoxia en donde podría darse una acumulación y/o digestión más lenta del alimento ingerido, a diferencia de en aquellos animales mantenidos en condiciones de normoxia en donde el metabolismo basal siguió realizándose en condiciones aeróbicas normales. Por su parte, no hubo diferencias significativas en lo que respecta al índice hepatosomático (IHS, %), aunque se pudo apreciar una tendencia decreciente a medida que se aumentaba la dosis de suplementación, pudiéndose relacionar con una menor acumulación de grasa en el hígado, cuyo hecho responde a un favorecimiento de circulación, transporte y uso energético, creando una optimización por parte del individuo en la retención energética (García-Meilán, 2009), insinuando beneficios sobre el uso de *Prebiodo II* como un compuesto simbiótico asimilable y altamente utilizable, que cumplirá determinadas funciones fisiológicas, sin necesidad de ser almacenado y poder producir problemas comunes en la práctica acuícola, como es la aparición de hígado graso. Tanto en el grupo control como en el suplementado al 1%, se observó una leve disminución de este índice en condiciones de hipoxia moderada, sugiriendo un uso de la reserva hepática para afrontar la condición de estrés sufrida.

El conjunto de metabolitos analizados y posteriormente estudiados permitirán conocer de manera más concreta el estado interno metabólico en el que se encontraban los individuos tras haber sido sometidos a hipoxia moderada. Los patrones que siguen los metabolitos plasmáticos, hepáticos y musculares revelan el balance entre el transportes y la acumulación energéticos modulados por los individuos en periodos de bajo oxígeno, donde las células regulan la forma de obtener energía, modulando i) el uso de ATP, ii) las enzimas clave en el uso energía metabólica y iii) la respiración mitocondrial (Farhat y Weber, 2021), pudiendo a llevar a cabo la glucólisis anaeróbica en lugar de la fosforilación oxidativa (Magnoni et al., 2017). De forma paralela, el cortisol juega un papel fundamental en el sistema de estrés, desencadenando una serie de adaptaciones que permiten al individuo recuperar su estado de homeostasis en situaciones puntuales. Sin embargo, en aquellas situaciones donde el estrés perdura en

el tiempo, los ajustes a los que recurre el animal perjudicará de forma directa sobre el uso energético, influenciando procesos de crecimiento, reproducción, sistema inmunológico, osmorregulación y resiliencia (Billard et al., 1981). En nuestro estudio, se pudieron observar niveles significativamente menores de esta hormona en ambos grupos suplementados con *Prebiodo II* con respecto al control, tanto en normoxia como en hipoxia, pudiendo sugerir que una pequeña inclusión de este nutracéutico supone una ventaja a nivel fisiológico, atenuando la síntesis y liberación de cortisol al plasma, tanto en condiciones normales como en aquellas desfavorables producidas por un estrés por hipoxia. En primera instancia, los centros neuronales del hipotálamo anterior y medial (eje hipotálamo-simpático-cromafín, HSC), detectan alteraciones en el estado homeostático del individuo, dando como respuesta la síntesis y liberación de catecolaminas (adrenalina/noradrenalina) desde el tejido cromafín. En este caso, se producirá una movilización de los sustratos energéticos con la consecuente hiperglucemia, permitiendo aumentar la frecuencia respiratoria y cardiaca, así como el transporte de oxígeno (Wandelaar, 1997). En este estudio, el mantenimiento de hipoxia moderada durante 24 horas supuso inducir el estado de estrés, considerado de forma aguda, en fase de resistencia, llevando al animal a adaptarse a la situación y a activar el eje hipotálamo-hipofisario-interrenal (HHI), suponiendo la liberación de corticoides adrenales, el cortisol, que en conjunto estimula la movilización de reservas energéticas en plasma, produciendo igualmente hiperglucemia (Sumpter et al., 1997).

Por su parte, el hígado es el principal órgano donde se produce la conversión glucosa/glucógeno, amoniogénesis, síntesis de ácidos grasos y la gluconeogénesis en teleósteos (Soengas et al., 2019), por lo que el leve aumento de glucosa en plasma observado en los individuos sometidos a hipoxia, reflejado además en el descenso de glucógeno en hígado de los mismos, sugiere la movilización de sustratos energéticos como consecuencia de un aumento en la tasa metabólica basal orquestada por el cortisol, activando tanto el eje HSC como el HHI. En general, los resultados obtenidos en los individuos suplementados con *Prebiodo II*, suponen una menor liberación de glucosa en sangre, pudiendo relacionarse esto con la menor síntesis de cortisol en dichos grupos, y por tanto a la menor necesidad de movilizar reservas energéticas. Paralelamente, el lactato se puede tomar como un indicador metabólico de estrés, ya que indica la

activación del metabolismo anaeróbico a nivel muscular como vía de abastecimiento energético alternativa en situaciones donde los requerimientos de energía son mayores (Cádiz et al., 2015), como puede ser la hipoxia moderada inducida. Aludiendo a esto, los valores obtenidos de lactato, tanto en plasma como en músculo, son significativamente mayores en los individuos que han seguido la dieta control, pudiendo ser relacionado con los mayores niveles de cortisol experimentados por los mismos, recurriendo a la activación de ambos ejes o sistemas endocrinos, y la síntesis y liberación de adrenalina, noradrenalina y cortisol (Magnoni et al., 2017).

La metabolización de lípidos también puede ser estimulada por el cortisol, entre otras hormonas, fomentando el proceso de lipólisis para la formar ácidos grasos libres y glicerol (Van der Bon et al., 1991), de manera que se produzca tanto la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos como la degradación de glicerol, ingresando en el ciclo de Krebs y, posteriormente, en la vía gluconeogénica para acabar formando glucosa o glucógeno (Tocher, 2010). Nuestros resultados sugieren una mayor metabolización de triglicéridos en los individuos alimentados con la dieta control para formar glucosa, mostrando un descenso significativo de triglicéridos hepáticos, así como incremento de glucosa, en los individuos sometidos a hipoxia. Sin embargo, en los individuos alimentados con la dieta suplementada con *Prebiodo II*, la inducción a hipoxia no parece haber generado alteraciones significativas sobre este metabolito, volviendo a concluir una mayor atenuación sobre el uso energético en situaciones estresantes. Por su parte, el colesterol, es considerado el lípido más importante en el mundo animal, estando implicado en la estructuración de membranas, así como siendo un precursor hormonal y vitamínico (Larsson y Fange, 1976; Tocher, 2010), por lo que sus valores deberán ser los suficientes para no producir alteraciones en las membranas, perjudicando su propiedades físico-químicas y fluidez, además de no generar exceso y deposición en órganos no deseados. El papel estructural que juega el colesterol junto a las proteínas puede verse perjudicado por estímulos estresantes. La supresión metabólica que éste causa podrá generar una reducción de los valores de colesterol, provocando efectos sobre la actividad de proteínas membranales y suponiendo, a su vez, reducciones en la regulación de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa para disminuir la demanda de ATP. Por otro lado, reducir la abundancia de los ácidos grasos omega-3 22:6 (ácido decosaheptaenoico, DHA)

en la membrana fosfolipídica es otra manera de generar restricciones energéticas para la actividad de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, ya que este ácido graso es el activador de la bomba iónica (Farhat y Weber, 2021). Además, se minimizará el flujo a través de vías anabólicas como la síntesis de proteínas, causando la inhibición de enzimas clave del metabolismo energético (Farhat et al., 2019). Dado esto, los niveles de colesterol, así como de proteína, será indicador del efecto que causa el agente estresante sobre el individuo. El análisis de nuestros datos muestra que los niveles tanto de colesterol como de proteína plasmáticos en condiciones normales, han experimentado una tendencia significativa y dosis-dependiente. En relación a esto, el único grupo que no ha experimentado significancia en hipoxia con respecto a normoxia, ha sido el grupo suplementado con *Prebiodo II* al 1% que muestra simultáneamente los mayores niveles de proteína en plasma, concluyendo un menor efecto sobre el transporte y movilización energética de estos metabolitos y corroborando mayor atenuación de los efectos negativos de la hipoxia sobre los individuos.

Por último, el análisis de agua reflejará la metabolización de los nutrientes desde un punto de vista externo (Hlordzi et al., 2020), siendo considerados como productos de desecho del metabolismo. La digestión y asimilación de los diferentes nutrientes que componen una dieta está directamente relacionada con la microbiota intestinal, así como con las diferentes relaciones entre enzimas y bacterias que la componen, siendo imprescindibles para favorecer la digestibilidad y asimilación de los nutrientes, de manera que el aprovechamiento nutricional sea máximo y los desechos al medio procedentes del metabolismo los mínimos (Ekamnn et al., 2013). Así mismo, se ha visto que la existencia de microorganismos eficientes incluidos en las dietas puede favorecer cambios ambientales positivos en la calidad del agua, reduciendo las concentraciones de amonio, nitrato y nitrito liberadas en las heces o por la orina, ofreciendo una alternativa como biorremediación ante los excesos de materia orgánica procedente de excreciones, alimento no consumido e insumos adicionales (Wang et al., 2019). Por tanto, las relaciones enzimático-bacterianas procedentes de las extracciones de las macroalgas contenidas en *Prebiodo II* han mostrado ser eficaces sobre la liberación de especies de nitrógeno (amonio y nitrito). En ambos análisis, se ha observado una tendencia significativa y decreciente a medida que la inclusión de este nutracéutico

simbiótico aumentaba, destacando que el grupo suplementado al 3,5 % y sometido a hipoxia, no ha demostrado significancia estadística con respecto al grupo en normoxia, sugiriendo una menor proporción de proteína no digestible y un mayor aprovechamiento proteico y energético, incluso en situaciones de estrés donde el catabolismo muscular se produce en mayor medida (van der Boon et al., 1991).

## 5. CONCLUSIONES

En base a los resultados reflejados en el presente estudio, aludidos a los diferentes efectos producidos por la suplementación con el compuesto *Prebiodo II* en dietas con alto porcentaje de contenido vegetal sobre juveniles de dorada (*Sparus aurata*), se procede a esclarecer las siguientes conclusiones:

1. Los individuos experimentales no mostraron rechazo a las dietas suplementadas formuladas y suplementadas con *Prebiodo II*, mostrando índices de crecimiento, desarrollo y bienestar animal normales para la especie.
2. La suplementación con *Prebiodo II* favorece la orquestación metabólica, mejorando y manteniendo el estado homeostático y la redistribución energética durante la exposición a hipoxia moderada.
3. El nutracéutico simbiótico natural a base de hidrolizados de alginato y extracciones enzimático-bacterianas (*Prebiodo II*) podrían suponer una mejora sobre la cascada endocrina organizada por el cortisol, siendo buena alternativa como atenuante de estrés.
4. Se demuestra una disminución en la concentración de especies de nitrógeno (amonio y nitrito) en el agua, lo que pone de manifiesto una mejora sobre la calidad de agua de cultivo y los efluentes vertidos al medio.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

APROMAR OPP-30 (2022). *La acuicultura en España*.

Billard, R., Bry, C. and Gillet, C. (1981). *Stress, environment and reproduction in teleost fish*. Stress and fish, Academic Press, 0-12-554550-9.

Cádiz, L., Román-Padilla, J., Gozdowska, M., Kulczykowska, E., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J.M. y Martos-Sitcha, J.A. (2015). *Cortisol modulates vasotocinergic and isotocinergic pathways in the gilthead sea bream*. The Journal of Experimental Biology, 218, 1-10.

Calderer Reig, A. (2001). *Influencia de la temperatura y la salinidad sobre el crecimiento y consumo de oxígeno de la dorada (Sparus aurata L.)*. Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas, Universidad de Barcelona.

Cain, K. y Swan, C. (2010). *Barrier function and immunology*. The Multifunctional Gut of Fish. Fish Physiology, 30, 111-126.

Carlberg, J.M., Van-Olst, J.C., Massingill, M.J. y Chamberlain, R.J. (2002). *Aquaculture wastewater treatment system and method of making same*. Kent Sea Tech Corp, A Corporation of California.

Cerezuela Cabrera, R. (2012). *Nuevos probióticos y prebióticos para dorada (Sparus aurata L.)*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.

Ekman, K. S., Dalsgaard, J., Holm, J., Campbell, P. J. y Skov, P.V. (2013). *Effects of dietary energy density and digestible protein: energy ratio on de novo lipid synthesis from dietary protein in gilthead sea bream (Sparus aurata) quantified with stable isotopes*. British Journal of Nutrition, 110, 1771-17781.

Farhat, E., Turenne, E. D., Choi, K. y Weber, J. M. (2019). *Hypoxia-induced remodelling of goldfish membranes*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 237, 110326.

Farhat, E. y Weber, J. M. (2021). *Hypometabolic responses to chronic hypoxia: A potential role for membrane lipids*. Metabolites, 11 (8): 503.

- Henrique, M.M.F., Gomes, E.F., Gouillou-Coustans, M.F., Oliva-teles, A. y Davies, J. (1998). *Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, Sparus aurata*. *Aquaculture* 161, 1-4, 415-426.
- FAO (2022). *El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura*.
- FAO (2022). *Thinking about the future of food safety- A foreing report*.
- García-Meilán, I., Valentín, J. M., Navarro, I., Pérez-Sancho, J. y Gallardo, M. A. (2009). *Afectación del metabolismo hepático debida a la alimentación con una dieta altamente sustituida en aceite y harina de pescado en dorada*. XII Congreso Nacional de Acuicultura. Sección de Nutrición.
- Hadj-Tajeb, A., Ghorbel, M., Hadj-Hamida, N.B., y Jarbui, O. (2013). *Sex ratio, reproduction, and growth of the gilthead sea bream, Sparus aurata (Pisces:Sparidae), in the Gulf of Gabes, Tunisia*. *Ciencias Marinas*, 39, 101-112.
- Hlordzi, V., Kuebutornye, F.K.A., Afriyie, G., Abarike, E.D., Lu, Y., Chi, S. y Anokyewaa, M.A. (2020). *The use of Bacillus species in maintenance of water quality in aquaculture: A review*. *Aquaculture Reports*. Vol 18, 100503.
- Hoseinifar, S.H., Sun, Y.Z., Wang, A. y Zhou, Z. (2018). *Probiotics as mean of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspective*. *Frontiers in Microbiology*, Vol 9, nº 2429.
- Jerez-Cepa, I. (2019). *Bienestar animal en el cultivo de la dorada (Sparus aurata): Mecanismos de atenuación del estrés*. Tesis Doctoral, Universidad de Cádiz.
- Lieke, T., Meinelt, T., Hoseinifar, S.H., Pan, B., Straus, D.L. y Steinberg, C.E.W. (2019). *Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases*. *Reviews in Aquaculture*, Vol 12, Issue 2, 943-965.
- Maccormack, T.J., Driedzic, W.R. (2004). *Cardiorespiratory and tissue adenosine responses to hypoxia and reoxygenation in the short-horned sculping Myoxocephalus Scorpius*. *Journal of Experimental Biology*. 207(Pt 23): 4157-64.

- MacLeod, M. J., Hasan, M. R., Robb, D. H. F. y Mamun-Ur-Rashid, M. (2020). *Quantifying greenhouse gas emissions from global aquaculture*. Scientific Reports, 10, 11679.
- Magnoni, L.J., Martos-Sitcha, J.A., Queiroz, A., Calduch-Giner, J.A., Magalhães-Gonçalves, J.F., Rocha, C.M.R., Abreu, J.W., Ozorio, R.O.A y Pérez-Sánchez, Jaume. (2017). *Dietary supplementation of heat-treated Gracilaria and Ulva seaweeds enhanced acute hypoxia tolerance in gilthead sea bream (Sparus aurata)*. Biology Open 6(6): 897-908.
- Mancera, J.M. y Martín, M.P. (2014). *El sistema de estrés en peces teleósteos*.
- Martos-Sitcha, J.A., Mancera, J.M, Prunet, P. y Magnoni., L.J. (2020). *Editorial: Welfare and Stressors in Fish: Challenges Facing Aquaculture*. Frontiers in Physiology, 11, 162.
- Martos-Sitcha, J.A., Simó-Mirabet, P., de las Heras, V., Calduch-Giner, J.A. y Pérez-Sánchez, J. (2019). *Tissue-Specific Orchestration of Gilthead Sea Bream Resilience to Hypoxia and High Stocking Density*. Frontiers in Physiology, 10.
- Martos-Sitcha, J.A., Wunderink, Y.S., Straatjes, J., Skrzynska, A.K., Mancera, J.M. y Martínez-Rodríguez, G. (2014). *Different stressors induce differential responses of the CRH-stress system in the gilthead sea bream (Sparus aurata)*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 177, 49-61.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2021). *Estadísticas de la Pesca y la Acuicultura. Encuesta de establecimientos de acuicultura*.
- Moreno, L. (2022). *Uso de extractos de macroalgas como aditivos en la dieta de la dorada (Sparus aurata) sobre el crecimiento y bienestar animal*. Trabajo Fin de Grado en Ciencias del Mar. Universidad de Cádiz.
- Ortega, A. (2008). *Cultivo de dorada (Sparus aurata)*. Colección Cuadernos de Acuicultura, nº 1. FOESA, CSIC y MARM. Madrid, 44 pp.
- Piazzon, M.C, Calduch-Giner, J.A., Fouz, B., Estensoro, I., Simó-Mirabet, P., Puyalto. M., Karalazos, V., Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A. y Pérez-Sánchez, J. (2017). *Under*

*control: how a dietary additive can restore the gut microbiome and proteomic profile, and improve disease a resilience in a marine teleostean fish fed vegetable diets.* Microbiome 5:164.

Shi, Q., Yu, C., Zhu, D., Li, S. y Wen, X. (2020). *Effects of dietary Sargassum horneri on resisting hypoxia stress, which changes blood biochemistry, antioxidant status, and hepatic HSP m RNA expressions of juvenile black sea bream Acanthopagrus schlegelii.* Journal of Applied Phycology 32, 3457-3466.

Soengas, J. L., Sangio-Alvarellos, S., Laiz-carrión, R. y Mancera, J. M. (2019). *Energy metabolism and osmotic acclimation in teleost fish.* Book Fish Osmoregulation, Chapter 10.

Speers-Roesch, B., Sandblom, E., Lau, G. Y., Farrell, A. P. y Richards, J. G. (2009). *Effects of environmental hypoxia cardiac energy metabolism and performance in tilapia.* The American Physiology Society. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 298: R104-R119.

Sumpter, J. P. (1997). *The endocrinology of stress.* Fish stress and health in aquaculture. Cambridge University Press, Cambridge, 95-118.

Tocher, D. R. (2010). *Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish.* Reviews in Fisheries Science, Volume 11, 2, 107-184.

Van der Boon, J., Van den Thillart, G. E. E. J. y Addink, A. D. F. (1991). *The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish.* Comp. Biochem. Physiol, Vol. 100A, no. 1, 47-53.

Verberk, W.C.E.P., Sandker, J.F., van de Pol, I.L.E., Urbina, M.A., Wilson, R.W., Mckenzie, D.J. y Leiva, F.P. (2021). *Body mass and cell size shape the tolerance of fishes to low oxygen in a temperature-dependent manner.* Global Change Biology, 00:1-13.

Wendelaar Bonga, S. E. (1997). *The stress response in fish.* Physiological Reviews, vol. 77, no. 3.

Wang, L., Shao X., Xu, M. y Chen, S. (2019). *Bioremediation of nitrogen- and phosphorus- polluted aquaculture sediment by utilizing combined immobilized effective microorganisms and sediment aeration technology*. International Journal of Agricultural and Biological Engineering, 12 (6), 192-201.

## ANEXOS

**Tabla 1.** Niveles de metabolitos plasmáticos [A: Lactato (Mm), B: Glucosa (Mm), C: Triglicéridos (TAG, Mm), D: Colesterol (mg/dL), E: Proteínas (mg/dL)] y F: Cortisol (ng/dL) en juveniles de *Sparus aurata* alimentados con diferentes dietas experimentales (Control, B 1% y B 3,5%) y sometidos a diferentes concentraciones/saturaciones de oxígeno (normoxia e hipoxia). Resultados expresados como el promedio  $\pm$  EEM, y analizados mediante análisis ANOVA de dos vías. Las diferentes letras minúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo normoxia. Las diferentes letras mayúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo hipoxia. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas entre diferentes saturaciones de oxígeno dentro de una misma dieta ( $p$ -valor $<0,05$ ).

		Control		B 1%		B 3,5%		p-valor		
		Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Dieta	[O <sub>2</sub> ]	Interacción
A	Lactato (mM)	0,91 $\pm$ 0,03	1,42 $\pm$ 0,20 <sup>B*</sup>	1,02 $\pm$ 0,03	1,29 $\pm$ 0,10 <sup>A</sup>	1,26 $\pm$ 0,13	1,28 $\pm$ 0,07 <sup>A</sup>	0,737	0,002	0,188
B	Glucosa (mM)	3,62 $\pm$ 0,15	4,16 $\pm$ 0,15	3,55 $\pm$ 0,09	3,76 $\pm$ 0,22	3,28 $\pm$ 0,21	4,28 $\pm$ 0,25*	0,623	0,004	0,231
C	TAG (mM)	4,38 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	3,85 $\pm$ 0,46	4,50 $\pm$ 0,46 <sup>ab</sup>	5,3 $\pm$ 0,66	6,88 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>	3,89 $\pm$ 0,55*	0,040	0,661	0,035
D	Colesterol (mg/dL)	217,9 $\pm$ 14,5 <sup>a</sup>	228,8 $\pm$ 14,6 <sup>A*</sup>	274,1 $\pm$ 14,5 <sup>b</sup>	240,0 $\pm$ 8,7 <sup>B</sup>	286,4 $\pm$ 15,0 <sup>b</sup>	229,9 $\pm$ 14,1 <sup>AB*</sup>	0,025	0,023	0,056
E	Proteínas (mg/dL)	33,25 $\pm$ 1,12 <sup>a</sup>	34,60 $\pm$ 0,62	35,01 $\pm$ 1,67 <sup>ab</sup>	36,36 $\pm$ 1,21	36,20 $\pm$ 1,23 <sup>b</sup>	34,77 $\pm$ 0,49	0,215	0,634	0,338
F	Cortisol (ng/dL)	29,39 $\pm$ 8,13 <sup>b</sup>	17,62 $\pm$ 6,93 <sup>B</sup>	4,24 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup>	8,45 $\pm$ 3,5 <sup>A*</sup>	7,61 $\pm$ 3,67 <sup>a</sup>	9,24 $\pm$ 3,09 <sup>A</sup>	0,016	0,681	0,359

**Tabla 2.** Niveles de metabolitos hepáticos [A: Lactato (mmol/gpf), B: Triglicéridos (TAG, mmol/gpf), C: Glucosa (mmol/gpf) y D: Glucógeno (mmol/gpf)] en juveniles de *Sparus aurata* alimentados con diferentes dietas experimentales (Control, B 1% y B 3,5%) y sometidos a diferentes concentraciones/saturaciones de oxígeno (normoxia e hipoxia). Resultados expresados como el promedio  $\pm$  EEM, y analizados mediante análisis ANOVA de dos vías. Las diferentes letras minúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo normoxia. Las diferentes letras mayúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo hipoxia. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas entre diferentes saturaciones de oxígeno dentro de una misma dieta ( $p$ -valor $<0,05$ )

		Control		B 1%		B 3,5%		p-valor		
		Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Dieta	[O <sub>2</sub> ]	Interacción
A	Lactato (mmol/gpf)	0,41 $\pm$ 0,14 <sup>ab</sup>	0,72 $\pm$ 0,14 <sup>A</sup>	0,32 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,84 $\pm$ 0,17 <sup>B*</sup>	0,83 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	0,84 $\pm$ 0,09 <sup>B</sup>	0,020	0,050	0,294
B	TAG (mmol/gpf)	57,5 $\pm$ 10,21	44,89 $\pm$ 4,58*	38,16 $\pm$ 7,02	49,23 $\pm$ 8,04	65,71 $\pm$ 1,16	54,86 $\pm$ 7,93	0,667	0,025	0,606
C	Glucosa (mmol/gpf)	6,48 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>	6,02 $\pm$ 0,20 <sup>A</sup>	6,99 $\pm$ 1,17 <sup>ab</sup>	7,67 $\pm$ 0,69 <sup>B</sup>	8,19 $\pm$ 1,32 <sup>b</sup>	7,46 $\pm$ 0,72 <sup>B</sup>	0,011	0,291	0,274
D	Glucógeno ( mmol/gpf)	118,5 $\pm$ 3,0	128,7 $\pm$ 4,9 <sup>B</sup>	125,2 $\pm$ 4,4	125,5 $\pm$ 4,1 <sup>AB</sup>	123,5 $\pm$ 1,2	115,6 $\pm$ 3,9 <sup>A*</sup>	0,453	0,823	0,170

**Tabla 3.** Niveles de metabolitos musculares [A: Lactato (mmol/gpf), B: Triglicéridos (TAG, mmol/gpf), C: Glucosa (mmol/gpf) y D: Glucógeno (mmol/gpf)] en juveniles de *Sparus aurata* alimentados con diferentes dietas experimentales (Control, B 1% y B 3,5%) y sometidos a diferentes concentraciones/saturaciones de oxígeno (normoxia e hipoxia). Resultados expresados como el promedio  $\pm$  EEM, y analizados mediante análisis ANOVA de dos vías. Las diferentes letras minúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo normoxia. Las diferentes letras mayúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo hipoxia. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas entre diferentes saturaciones de oxígeno dentro de una misma dieta ( $p$ -valor $<0,05$ ).

		Control		B 1%		B 3,5%		p-valor		
		Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Dieta	[O <sub>2</sub> ]	Interacción
A	Lactato (mmol/gfp)	25,51 $\pm$ 1,48	33,6 $\pm$ 1,69 <sup>B*</sup>	32,76 $\pm$ 2,5	28,23 $\pm$ 2,21 <sup>A</sup>	28,3 $\pm$ 2,69	27,22 $\pm$ 2,79 <sup>A</sup>	0,748	0,425	0,105
B	TAG (mmol/gfp)	4,47 $\pm$ 0,59	7,28 $\pm$ 0,82 <sup>A</sup>	6,47 $\pm$ 0,52	9,76 $\pm$ 1,97 <sup>B*</sup>	6,48 $\pm$ 1,19	7,64 $\pm$ 1,43 <sup>AB</sup>	0,386	0,210	0,711
C	Glucosa (mmol/gfp)	0,32 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	0,49 $\pm$ 0,13 <sup>A</sup>	1,65 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>	0,71 $\pm$ 0,16 <sup>AB*</sup>	0 <sup>a</sup>	1,6 $\pm$ 0,38 <sup>B*</sup>	0,009	0,052	0,002
D	Glucógeno (mmol/gfp)	5,32 $\pm$ 0,93 <sup>b</sup>	3,40 $\pm$ 0,79 <sup>*</sup>	3,12 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	3,88 $\pm$ 0,83	2,21 $\pm$ 0,83 <sup>a</sup>	2,48 $\pm$ 0,6	0,092	0,680	0,262

**Tabla 4.** Niveles en agua de A: pH, B: Amonio (NH<sub>4</sub>, ppm) y C: Nitrógeno de nitritos (NO<sub>2</sub>, ppm) en el medio donde juveniles de *Sparus aurata* fueron alimentados con diferentes dietas experimentales (Control, B 1% y B 3,5%) y sometidos a diferentes concentraciones/saturaciones de oxígeno (normoxia e hipoxia). Resultados expresados como el promedio  $\pm$  EEM, y analizados mediante análisis ANOVA de dos vías. Las diferentes letras minúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo normoxia. Las diferentes letras mayúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas experimentales para el grupo hipoxia. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas entre diferentes saturaciones de oxígeno dentro de una misma dieta ( $p$ -valor $<0,05$ ; ND: No Detectado).

		Control		B 1%		B 3,5%		p-valor		
		Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia	Dieta	[O <sub>2</sub> ]	Interacción
A	pH	7,71	7,90	7,68	8,24	7,64	8,59			
B	Amonio (ppm)	ND	0,042 $\pm$ 0,005 <sup>C***</sup>	ND	0,019 $\pm$ 0,001 <sup>B**</sup>	ND	0,011 $\pm$ 0,007 <sup>A</sup>	0,001	<0,0001	0,001
C	NO <sub>2</sub> (ppm)	0,307 <sup>b</sup>	0,345 $\pm$ 0,017 <sup>B*</sup>	0,211 <sup>a</sup>	0,252 $\pm$ 0,013 <sup>A*</sup>	0,210 <sup>a</sup>	0,231 $\pm$ 0,007 <sup>A</sup>	<0,0001	0,0003	0,679