

**DESARROLLO DE UNA  
FORMULACIÓN DE  
ENRIQUECIMIENTO DE  
ALIMENTO VIVO BASADA EN  
MICROALGAS Y PROBIÓTICOS  
PARA ALIMENTACIÓN DE  
LARVAS DE DORADA  
(*Sparus aurata* Linnaeus, 1758)**

**Carlos Recuero Rodríguez**

Trabajo de Fin de Máster

Máster Gallego Interuniversitario en Acuicultura

Orientadora: Dra. Patrícia Diogo

Curso 2022/2023



# ÍNDICE

<b>1.- Introducción</b> .....	<b>2</b>
1.1.- Cultivo larvario de dorada ( <i>Sparus aurata</i> ) y enriquecimiento de alimento vivo para nutrición de larvas de peces marinos.....	2
1.2.- Requisitos nutricionales de las larvas de dorada ( <i>Sparus aurata</i> ).....	3
1.3.- Productos comerciales de enriquecimiento de alimento vivo: características y desafíos frente a un desarrollo sostenible.....	5
1.4.- Perspectivas del uso de microalgas y probióticos en acuicultura.....	6
1.5.- Investigación y desarrollo científico en Necton S.A. de cara al sector acuícola.....	8
<b>2.- Objetivos</b> .....	<b>9</b>
<b>3.- Procedimientos y metodología</b> .....	<b>9</b>
3.1.- Formulación y elaboración de un producto para enriquecimiento de alimento vivo para larvas de peces marinos.....	9
3.2.- Producción industrial de biomasa microalgal para la elaboración de las formulaciones desarrolladas de un nuevo producto de enriquecimiento de alimento vivo.....	11
3.3.- Análisis de las formulaciones desarrolladas para enriquecimiento de alimento vivo y un producto comercial control.....	13
3.4.- Desarrollo del protocolo de aplicación y establecimiento de dosis para el nuevo producto desarrollado.....	17
3.5.- Ensayo “ <i>in vivo</i> ” del producto de enriquecimiento de alimento vivo en cultivo larvario de dorada ( <i>Sparus aurata</i> ).....	20
3.6.- Ensayo de estrés por transporte de larvas de dorada ( <i>Sparus aurata</i> ) cultivadas con productos piloto y control después del destete.....	24
3.7.- Análisis de datos.....	25
<b>4.- Resultados</b> .....	<b>26</b>
4.1.- Composición proximal y características de los productos de enriquecimiento vivo.....	26
4.2.- Verificación del grado de enriquecimiento del alimento vivo (rotíferos) con las nuevas formulaciones desarrolladas.....	31
4.3.- Ensayo “ <i>in vivo</i> ” del producto de enriquecimiento de alimento vivo en cultivo larvario de dorada ( <i>Sparus aurata</i> ).....	32
4.4.- Ensayo de estrés por transporte de larvas de dorada ( <i>Sparus aurata</i> ) cultivadas con productos piloto y control después del destete.....	37
<b>5.- Discusión</b> .....	<b>38</b>
<b>6.- Conclusiones</b> .....	<b>45</b>
<b>7.- Agradecimientos</b> .....	<b>47</b>
<b>8.- Bibliografía</b> .....	<b>47</b>
<b>9.- Anexos</b> .....	<b>53</b>

# 1.- INTRODUCCIÓN

## 1.1.- Cultivo larvario de dorada (*Sparus aurata*) y enriquecimiento de alimento vivo para nutrición de larvas de peces marinos

La acuicultura, y en concreto el cultivo de peces, es una de las actividades económicas con mayor grado de desarrollo en las últimas décadas a nivel mundial y europeo (APROMAR, 2022; FAO, 2022). En este sentido, la actividad acuícola ha superado por séptimo año consecutivo a la pesca extractiva en términos productivos a escala mundial, y su crecimiento constante se ha consolidado anualmente (APROMAR, 2022). En el contexto europeo, España es uno de los máximos productores en el sector acuícola junto con otros países de la cuenca mediterránea tales como Francia, Grecia, Italia o Turquía (Aragão et al., 2019; APROMAR, 2022; FAO, 2022). Concretamente, la dorada (*Sparus aurata*) es una de las especies con mayor tasa de producción en los países mencionados anteriormente junto con la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*), siendo la segunda especie cultivada en Europa con mayor importancia económica (Aragão et al., 2019; APROMAR, 2022). En España, su producción anual en 2021 se situó en unas 9.632 toneladas con 27 millones de juveniles producidos, y tiene especial relevancia en áreas como la Comunidad Valenciana, Región de Murcia y Andalucía (APROMAR, 2022).

El cultivo larvario de dorada y de otras especies se desarrolla en condiciones controladas en cautiverio, en instalaciones de maternidad habitualmente denominadas “*hatcheries*”. Debido a sus dimensiones reducidas y a su comportamiento, las larvas de peces marinos constan de unas necesidades nutricionales específicas para su adecuado desarrollo (Pousão Ferreira, 2009). En este sentido, se han elaborado protocolos de alimentación larvaria para las principales especies de peces marinos cultivadas (Castanho et al., 2023).

Inicialmente, las larvas tienen un sistema digestivo poco desarrollado (larvas de tipo altricial), y durante los primeros días dependen de las reservas del saco vitelino (Conceição et al., 2010; Castanho et al., 2023). Seguidamente, en torno al tercer día después de la eclosión del huevo en el caso de la dorada, se produce la apertura de la boca y la dependencia de las reservas se reduce progresivamente (Conceição et al., 2010). A partir de la apertura de la boca en las larvas, la alimentación de larvas de peces marinos se realiza por medio del suministro de presas vivas. El grado de desarrollo de las larvas impide el suministro de dietas inertes en los 20-25 primeros días de vida, y además, el movimiento del alimento vivo promueve los mecanismos de captura por parte de las larvas de peces (Pousão Ferreira, 2009; Conceição et al., 2010; Maehre et al., 2013). Por otro lado, la mayoría de dietas formuladas como sustitutos del alimento vivo tienden a precipitar en la columna de agua o agregar en la superficie, mientras que las presas vivas se mantienen flotando en la columna disponibles para las larvas (Conceição et al., 2010).

El alimento vivo utilizado habitualmente es zooplancton, concretamente rotíferos (*Brachionus* sp.) y nauplios o metanauplios de artemias (*Artemia* sp.), pese a que no forman parte de la alimentación de las larvas de peces marinos en el medio natural (Conceição et al., 2010; Maehre et al., 2013). La utilización de estos organismos se debe a que presentan un tamaño adecuado, una natación lenta que impide su huida ante la depredación de las larvas, y además se pueden cultivar en altas densidades fácilmente (Conceição et al., 2010; Castanho et al., 2023). Además, presentan otras facilidades como un ciclo de vida corto en el caso de los rotíferos, y una alta capacidad de conservación de los cistes de resistencia en el caso de las artemias, para poder ser utilizados en el momento que se desee (Radhakrishnan et al., 2019; Castanho et al., 2023). Pese a que los copépodos forman parte de la dieta natural de las larvas de peces marinos, no son considerados como una alternativa consolidada debido a que su cultivo no está aún optimizado y el tiempo de conservación de éstos es reducido comparativamente (Conceição et al., 2010; Radhakrishnan et al., 2019; Paulo et al., 2020; Castanho et al., 2023).

Tanto los rotíferos como las artemias presentan deficiencias en sus perfiles nutricionales y no son especialmente indicados para alimentar larvas de peces marinos *per se* (Yamasaki et al., 2007; Conceição et al., 2010; Maehre et al., 2013; Watanabe et al., 2016; Castanho et al., 2023). En consecuencia, es necesario enriquecer el alimento vivo en un proceso denominado como bioencapsulación. Así, mediante la administración de dietas de enriquecimiento, se obtienen presas vivas con un perfil nutricional que satisface los requerimientos de las larvas de peces marinos, especialmente en aquellos parámetros que influyen directamente en el crecimiento larvario o en la incidencia de malformaciones esqueléticas durante el desarrollo (p.e. ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como el ácido docosahexaenoico o DHA, el ácido eicosapentaenoico o EPA y el ácido araquidónico o ARA) (Yamasaki et al., 2007; Maehre et al., 2013; Estévez & Giménez, 2017; Watanabe et al., 2016; Radhakrishnan et al., 2019).

La concepción tradicional de las presas vivas como “sacos de transporte”, con las mismas características nutricionales que los productos de enriquecimiento con las que se alimentan previamente, es errónea. Una vez administrada la dieta de enriquecimiento al alimento vivo, hasta que es ingerido por las larvas, el perfil nutricional se modifica con el paso del tiempo debido al metabolismo de estos animales (Conceição et al., 2010; Maehre et al., 2013; Estévez & Giménez, 2017; Radhakrishnan et al., 2019, Paulo et al., 2020). Por ello, es igualmente esencial desarrollar protocolos de enriquecimiento adecuados para rotíferos y artemias, con el objetivo de satisfacer las necesidades de las larvas de peces marinos una vez son alimentadas con presas vivas (Estévez & Giménez, 2017).

### **1.2.- Requisitos nutricionales de las larvas de dorada (*Sparus aurata*)**

El desajuste en la calidad nutricional del alimento suministrado frente a los requisitos nutricionales teóricos de las larvas de peces marinos es uno de los principales factores que resulta en menores tasas de crecimiento, en tasas de mortalidad más elevadas durante el cultivo e incluso en una mayor incidencia

de malformaciones esqueléticas (Estévez et al., 1999; Yamasaki et al., 2007; Pousão Ferreira, 2009; Watanabe et al., 2016; Radhakrishnan et al., 2019). En los últimos años, se han realizado diferentes estudios para estimar y cuantificar los requisitos nutricionales de las larvas de peces marinos en términos de macronutrientes, así como en relación con micronutrientes, minerales y vitaminas. En este sentido, los principales parámetros de los requerimientos nutricionales teóricos de las larvas de dorada (*Sparus aurata*) se reflejan en las Tablas 1, 2 y 3.

**Tabla 1:** Requerimientos nutricionales teóricos de macronutrientes (proteínas, lípidos y carbohidratos) de larvas de dorada (*Sparus aurata*).

NUTRIENTE	TIPO	PROPORCIÓN	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
<b>Proteínas</b>	Total	43 – 46%	Mongile et al., 2014 Houston et al., 2022
	Total	18 – 22%	Mongile et al., 2014 Houston et al., 2022
<b>Lípidos</b>	DHA	1,8 – 2% (mín. 0,8%)	Hamre et al., 2013 Arantzamendi et al., 2019
	EPA	1 – 1,15% (mín. 0,7%)	Hamre et al., 2013 Arantzamendi et al., 2019
	ARA	1% (mín. 0,5%)	Bessonart et al., 1999 Hamre et al., 2013
	DHA/EPA	mín. 1,2 ópt. 2	Izquierdo, 2005 Hamre et al., 2013
	EPA/ARA	mín. 2 ópt. 4	Hamre et al., 2013
	n-3 HUFA	1,5 – 2%	Hamre et al., 2013
	n-3/n-6	2,5	Bandarra et al., 2011
<b>Carbohidratos</b>	Total	< 20%	Morries & Davies, 1995 Enes et al., 2011

**Tabla 2:** Requerimientos nutricionales teóricos de minerales de larvas de dorada (*Sparus aurata*).

MINERAL	PROPORCIÓN/CONCENTRACIÓN	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
<b>Fósforo</b>	0,75%	Pimentel-Rodrigues & Oliva-Teles, 2001
<b>Manganeso</b>	36,5 – 43 mg/kg	Domínguez et al., 2019
<b>Cobre</b>	5,5 mg/kg	Domínguez et al., 2019
<b>Hierro</b>	150 mg/kg	Samartzis 2014
<b>Cobalto</b>	1,9 mg/kg	Domínguez et al., 2019

<b>Zinc</b>	60 – 150 mg/kg	Domínguez et al., 2017
<b>Selenio</b>	0,8 – 1 mg/kg	Domínguez et al., 2017 Domínguez et al., 2020

**Tabla 3:** Requerimientos nutricionales teóricos de vitaminas de larvas de dorada (*Sparus aurata*).

<b>VITAMINA</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</b>
<b>A</b>	5 – 10 mg/kg	Hamre et al. 2013
<b>C</b>	1800 mg/kg (mín. 100 mg/kg)	Izquierdo et al. 2019
<b>B1</b>	10 mg/kg (mín. 5 mg/kg)	Morries & Davies 1995
<b>B2</b>	5 µg/g (mín. 3 µg/g; máx. 11 µg/g)	Souto et al. 2008
<b>B6</b>	2 mg/kg	Kissil et al. 1981
<b>E</b>	1500 mg/kg (mín. 100 mg/kg; máx. 1800 mg/kg)	Izquierdo et al. 2019
<b>D3</b>	25 – 30 µg/kg	Sivagurunathan et al. 2022

### 1.3.- Productos comerciales de enriquecimiento de alimento vivo: características y desafíos frente a un desarrollo sostenible

La expansión del sector acuícola afronta hoy en día diferentes desafíos en el ámbito de conseguir una actividad sostenible y una visión circular económica, debido al alto grado de dependencia de materias primas como el aceite o la harina de pescado. Estos ingredientes son la base para la elaboración de los principales productos de enriquecimiento vivo actualmente comercializados a gran escala (p.e. Gama SELCO<sup>®</sup>, INVE; Red Pepper<sup>®</sup>, Bernaqua; Gama Ori<sup>®</sup>, Skretting). A causa de sus características nutricionales, palatabilidad y digestibilidad, son ideales para suplir las altas necesidades proteicas y lipídicas de peces marinos en su fase larvaria (Harel et al., 2002; Shepherd & Jackson, 2013; Hua et al., 2019; Jannathulla et al., 2019).

No obstante, la obtención de estas materias primas depende exclusivamente de la recolección de grandes cantidades de ejemplares de poblaciones naturales, como por ejemplo es el caso de la anchoveta peruana (*Engraulis ringens*) (Olsen & Hasan, 2012; Shepherd & Jackson, 2013; Cashion et al., 2017; Hua et al., 2019; Jannathulla et al., 2019). Debido al incremento de la inestabilidad climática en los últimos años, la extracción de estas especies es cada vez más inconsistente (Hardy, 2010; Shepherd & Jackson, 2013; Jannathulla et al., 2019). Adicionalmente, el control y la reducción de las cuotas de pesca a causa de la sobreexplotación de dichas poblaciones impide obtener cantidades que suplan las necesidades de una

demanda cada vez mayor de este tipo de materias primas (Olsen & Hasan, 2012; Shepherd & Jackson, 2013; Jannathulla et al., 2019). Así, la variabilidad del precio y la disponibilidad de los productos basados en aceite y harina de pescado ha aumentado especialmente en los años recientes (Shepherd & Jackson, 2013).

En consecuencia, es preciso intensificar la búsqueda de alternativas sostenibles con perfiles nutricionales adecuados que sustituyan este tipo de materias primas. Para ello, la competitividad en precio y un suministro continuo asegurado son dos de los factores clave para conseguir la incorporación de nuevos ingredientes sustitutos. Hasta el momento, alguna de las opciones propuestas han sido descartes procedentes de la ganadería, aceites de origen vegetal, microorganismos unicelulares o el empleo de proteína animal procedente de insectos (Hardy, 2010; Shepherd & Jackson, 2013; Aragão et al., 2019; Hua et al., 2019; Jannathulla et al., 2019). Sin embargo, ninguno de ellos ha conseguido establecerse en el mercado como una alternativa fiable por causas diferentes, o bien presentan desventajas frente al aceite y la harina de pescado (Olsen & Hasan, 2012; Vizcaíno et al., 2014; Aragão et al., 2019).

#### **1.4.- Perspectivas del uso de microalgas y probióticos en acuicultura**

Tradicionalmente, las microalgas no se han aplicado en acuicultura con objetivos nutricionales para el cultivo de peces marinos. No obstante, han sido ampliamente utilizadas para la alimentación de moluscos bivalvos, fases larvarias de gasterópodos marinos y larvas de crustáceos en estadios del desarrollo iniciales (Conceição et al., 2010). Asimismo, se han empleado de manera rutinaria especialmente en instalaciones de maternidad, para la aplicación de técnicas de agua verde con efectos beneficiosos en la supervivencia, ingestión del alimento y crecimiento de larvas de peces marinos (Conceição et al., 2010). Adicionalmente, son el principal alimento utilizado para los cultivos auxiliares de rotíferos o artemias (Conceição et al., 2010; Paulo et al., 2020). Hasta la actualidad, los productos comerciales basados en microalgas han tenido un bajo grado de desarrollo y madurez, siendo en su mayoría productos monoalgales no adaptados a las necesidades específicas del sector acuícola.

Teóricamente, la utilización de combinaciones de diferentes especies de microalgas es una buena estrategia para la formulación de dietas de enriquecimiento de alimento vivo, bajo los conceptos más recientes de sostenibilidad. Pese a que su inclusión en productos de alimentación en acuicultura ha sido descartada habitualmente debido a su alto coste de producción, es indiscutible que presentan múltiples beneficios biológicos para los peces marinos. En ese sentido, presentan perfiles nutricionales muy variados de modo que la combinación de diferentes especies puede ser una fuente de algunos de los lípidos esenciales para el desarrollo de las larvas de peces marinos, especialmente en el caso de ácidos grasos n-3 de cadena larga poliinsaturados (Conceição et al., 2010; Maehre et al., 2013; Paulo et al., 2020; Pulido-Rodríguez et al., 2021). Además, la biomasa microalgal tiene un perfil de aminoácidos similar en comparación con fuentes proteicas vegetales terrestres, y en muchos casos valores óptimos de suplementación de minerales y carotenoides (Paulo et al., 2020; Pulido-Rodríguez et al., 2021).

Uno de los principales problemas de cara a la aplicación de microalgas para la nutrición de peces marinos es el limitado o inexistente contenido en DHA en su composición bioquímica. Aquellas especies con mayor grado de inclusión de este ácido graso esencial en su composición son especialmente costosas en su producción, y los niveles proximales de DHA no alcanzan el mínimo requerido por parte de las larvas. Por ello, cada vez es más común el empleo de otros organismos unicelulares debido a sus interesantes perfiles nutricionales de cara a la nutrición en acuicultura. Si bien esta ya es una práctica habitual desde hace tiempo mediante la administración de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) para el enriquecimiento de alimento vivo, su perfil nutricional es relativamente pobre (Pousão Ferreira, 2009; Watanabe et al., 2016; Radhakrishnan et al., 2019). Desde el comienzo del siglo XXI, se ha instaurado de forma rutinaria la utilización de traustocitridios (Stramenopila) como *Aurantiochytrium* sp. en la elaboración de productos de enriquecimiento y alimentación en acuicultura (Harel et al., 2002; Watanabe et al., 2016; Radhakrishnan et al., 2019). Los traustocitridios son microorganismos eucariotas y heterótrofos hallados ampliamente en ecosistemas marinos, y resultan de interés debido a su alto contenido en ácidos grasos esenciales como DHA, EPA y ARA (Harel et al., 2002; Yamasaki et al., 2007; Watanabe et al., 2016; Radhakrishnan et al., 2019; Paulo et al., 2020).

Otro de los principales desafíos en acuicultura se basa en el control y mantenimiento de la salud de los peces. En la actualidad, las patologías son la causa de múltiples eventos de mortalidad en diferentes cultivos marinos y suponen una de las mayores fuentes de pérdidas económicas en el sector acuícola (Hai, 2015; Arechavala-López et al., 2018; Risjani et al., 2021; del Valle et al., 2023). Otro de los posibles beneficios resultantes de la utilización de microalgas es la presencia de compuestos bioactivos de interés como antioxidantes naturales, inmunoestimulantes o incluso metabolitos bactericidas (Conceição et al., 2010; Paulo et al., 2020; Casas-Arrojo et al., 2021; Pulido-Rodríguez et al., 2021).

Un buen ejemplo de ello es *Porphyridium cruentum*, una especie de microalga roja (Rhodophyta) ampliamente conocida por sus diferentes posibles aplicaciones en la industria. Los exopolisacáridos sulfatados producidos por esta especie, acumulados en la parte externa de la membrana celular, tienen potencial inmunoestimulante, posibles efectos citotóxicos y pueden actuar como promotores del crecimiento en peces (Zhao et al., 2020; Casas-Arrojo et al., 2021; Risjani et al., 2021; Liberti et al., 2023). Asimismo, su composición en términos de pigmentos resulta relevante para su posible aplicación en acuicultura debido a una presencia elevada de clorofilas, carotenoides, ficobilinas y ficoeritrina (Zhao et al., 2020; Liberti et al., 2023). En este sentido, se ha comprobado previamente que la inclusión de esta microalga en la dieta favorece la generación de respuestas inmunes en peces ante patógenos de gran relevancia como bacterias del género *Vibrio* o *Photobacterium damsela* subsp. *piscida*, aumentando los niveles de explosión respiratoria (Díaz-Rosales et al., 2008; Risjani et al., 2021).

Además de las microalgas, los probióticos son habitualmente utilizados como suplemento para el control de patologías en acuicultura (Hai, 2015). En piscicultura, los probióticos se definen como suplementos

de una o varias estirpes de microorganismos vivos o componentes celulares con efectos beneficiosos en el desarrollo de los peces (Hai, 2015; Hoseinifar et al., 2018). Por sí mismos, pueden ser utilizados como condicionadores del agua de los tanques de cultivo y moduladores de la microbiota intestinal (Olmos & Paniagua-Michel, 2014; Dawood et al., 2019). De esta manera, su aplicación supone la mejora de la resistencia de los peces cultivados a posibles eventos de estrés patológico, la inhibición de la proliferación de patógenos, la modulación de diferentes parámetros inmunológicos y el fomento de un mayor crecimiento de los peces cultivados (Hai, 2015; Hoseinifar et al., 2018; Dawood et al., 2019; del Valle et al., 2023). Por otro lado, se trata de un suplemento con alta versatilidad debido a que puede ser aplicado no sólo en cultivo de peces, sino también en cultivo de invertebrados e incluso en el enriquecimiento del alimento vivo (Hai, 2015; del Valle et al., 2023). Sin embargo, la aplicación de probióticos supone un aumento de las tareas técnicas a realizar diariamente en las plantas de cultivo larvario de peces marinos. Así, la combinación de probióticos y microalgas en una misma formulación funcional puede permitir la reducción de las tareas técnicas a realizar, además de potenciar sus propiedades entre ellos (Olmos & Paniagua-Michel, 2014; Dawood et al., 2019; Olmos et al., 2020).

### **1.5.- Investigación y desarrollo científico en Necton S.A. de cara al sector acuícola**

Necton S.A. es una compañía situada en Olhão (Algarve, Portugal) dedicada al cultivo y producción a escala industrial de sal y microalgas desde el año 1997. Más en detalle, los departamentos de producción e I+D de su marca Phytobloom<sup>®</sup> han concentrado sus esfuerzos en las últimas décadas en mejorar los procesos de producción industrial de microalgas, y desarrollar productos específicamente adaptados para las necesidades actuales de diferentes sectores. Así, Necton S.A. ha conseguido optimizar el cultivo de diferentes especies de microalgas relevantes para su aplicación en alimentación humana, cosmética y acuicultura.

La compañía se encuentra desde hace años involucrada en múltiples proyectos a escala nacional y continental junto con colaboradores como universidades, centros de investigación y otras compañías del mismo ámbito. En relación con el sector de piscicultura marina, destaca el proyecto ALLarvae, destinado a satisfacer las necesidades del sector mediante el empleo funcional de biomasa microalgal y probióticos, con el objetivo de optimizar los procesos de larvicultura marina. Por ello, en los últimos años se ha trabajado en la elaboración de formulaciones funcionales para aplicación de técnicas de agua verde (ALLGreen), dietas para rotíferos (ALLive) y dietas de enriquecimiento de alimento vivo (ALLarvae). El desarrollo de estos productos está basado en el hecho de que el cultivo larvario es uno de los puntos más críticos en el cultivo de peces, así como en la idea de que la aplicación funcional de estos ingredientes puede fomentar una mayor eficiencia biológica de las larvas mediante la promoción del crecimiento y el aumento de la resistencia frente a diferentes tipos de estrés.

## **2.- OBJETIVOS**

El presente Trabajo de Fin de Máster se enmarca en el ámbito del proyecto ALLarvae, liderado por la empresa Necton S.A., enfocado en el desarrollo de productos específicamente adaptados a las necesidades incipientes en el sector acuícola debido al aumento del grado de profesionalización y madurez en los últimos años. Por tanto, el objetivo principal consiste en el desarrollo de una formulación de enriquecimiento vivo basada mayoritariamente en microalgas y probióticos para nutrición de larvas de peces marinos. Para ello, es necesario evaluar la calidad y desempeño de la formulación piloto de enriquecimiento a escala laboratorial, con el objetivo de valorarla comparativamente en relación con uno de los principales productos comerciales destinados para este fin. En este sentido, tiene especial importancia la aplicación de la formulación desarrollada en el enriquecimiento de rotíferos y artemia para nutrición de larvas de dorada (*Sparus aurata*), con la intención de valorar los resultados obtenidos y la viabilidad de un producto de estas características en comparación con un producto de enriquecimiento actualmente comercializado a gran escala.

## **3.- PROCEDIMIENTOS Y METODOLOGÍA**

### **3.1.- FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DE UN PRODUCTO PARA ENRIQUECIMIENTO DE ALIMENTO VIVO PARA LARVAS DE PECES MARINOS**

#### **3.1.1.- Revisión bibliográfica para la elaboración de una formulación teórica inicial**

En primer lugar, fue realizada una búsqueda bibliográfica actualizada de los requisitos nutricionales teóricos de peces marinos, con especial atención a los valores referidos a larvas siempre que fuera posible. Para ello, la especie *Sparus aurata* fue elegida como modelo para el desarrollo de la formulación teórica inicial.

La principal razón para su elección como pauta de desarrollo del producto de enriquecimiento es el hecho de que se trata de una de las especies con mayor volumen de producción a nivel europeo, concretamente en torno a la cuenca mediterránea, siendo una especie de gran importancia económica en países como Grecia, Turquía o España (Ortega, 2008; APROMAR, 2022; FAO, 2023). Asimismo, es una de las especies acuícolas con mayor importancia en el ámbito científico en lo referente a publicaciones científicas relacionadas con acuicultura (APROMAR, 2022), lo que supone una mayor profundidad en los datos que se pueden encontrar a la hora de realizar una búsqueda bibliográfica relacionada con sus necesidades nutricionales. Adicionalmente, otra de las razones que impulsaron la elección de la dorada como modelo fueron las características de sus requisitos nutricionales teóricos, hallándose muy próximos a los de otras especies con importancia comercial como *Dicentrarchus labrax* o *Salmo salar* (Kousoulaki et al., 2015; Qian et al., 2020).

A grandes rasgos, se consultaron datos con relación a los requisitos de proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales (Tablas 1, 2 & 3). Especialmente, se valoraron aquellos parámetros que tienen

una gran importancia en el adecuado desarrollo de las larvas de peces marinos, en términos de conseguir un óptimo crecimiento y evitar la incidencia de malformaciones esqueléticas (Izquierdo, 1996; Cahu et al., 2003; Lall & Lewis-McCrea, 2007; Hamre et al., 2010; Haga et al., 2011). Algunos de esos indicadores evaluados fueron los porcentajes de lípidos esenciales tales como DHA, EPA y ARA y las proporciones DHA/EPA o EPA/ARA (Cahu et al., 2003; Lall & Lewis-McCrea, 2007). Asimismo, fueron consultados los niveles óptimos de inclusión de algunas vitaminas (p.e. vitaminas A, D, E o K) y el equilibrio proporcional necesario entre ellas para la elaboración de una correcta formulación (Izquierdo, 1996; Cahu et al., 2003; Lall & Lewis-McCrea, 2007; Hamre et al., 2010; Haga et al., 2011).

### **3.1.2.- Selección de tipología de producto para las formulaciones propuestas**

La tipología elegida para todas las formulaciones ALLarvae propuestas fue la de producto en polvo, debido a que consta de ciertas ventajas en comparación con formulaciones de tipo concentrado líquido de cara a su aplicación en acuicultura. En este sentido, la presencia de probióticos en la composición del producto promueve la elección de esta tipología, debido a que la humedad es uno de los principales factores que afecta a la viabilidad y efectividad de los microorganismos probióticos (Toledo et al., 2010). Asimismo, los productos con tipología en polvo tienen un método de almacenaje más sencillo, del mismo modo que su período de vida útil es superior en comparación con productos de otra tipología (Hedegaard & Skibsted, 2013). Si bien es cierto que cuenta con ventajas en lo relativo a su almacenaje, su método de utilización es más complejo en comparación con productos de tipo concentrado líquido que se pueden aplicar directamente en los tanques de cultivo. Esto es debido a la necesidad de hidratar previamente el producto en polvo en agua, y posteriormente mezclar con una batidora de vaso.

### **3.1.3.- Planteamiento de formulaciones teóricas para enriquecimiento de alimento vivo**

Con base en los requisitos nutricionales teóricos de la especie *Sparus aurata*, se plantearon dos formulaciones iniciales caracterizadas por la inclusión de diferentes especies de microalgas liofilizadas (mediante procesamiento “freeze-dried”), *Aurantiochytrium* sp. (Thraustochytriaceae, Stramenopila), probióticos y un “pre-mix” de vitaminas y minerales especialmente desarrollado para el cultivo de dorada (*Sparus aurata*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Tabla 4). Se desarrolló una formulación principal inicial que recibió el nombre de “ALLarvae 1.0”, y adicionalmente, se desarrolló otra versión alternativa que recibió la nomenclatura de “ALLarvae 1.0 POC” debido a la inclusión adicional de la especie de microalga roja *Porphyridium cruentum* (Tabla 4). La decisión de incluir esta especie de microalga en una formulación alternativa se tomó con base en las propiedades inmunoestimulantes y promotoras del crecimiento previamente comprobadas en peces marinos como *Solea senegalensis* o *Trachinotus ovatus* (Díaz-Rosales et al., 2008; Zhao et al., 2021).

Los porcentajes de inclusión de cada uno de los ingredientes se calcularon en función de los datos recogidos previamente en la empresa Necton S.A. relativos a la composición bioquímica de cada una de las especies de microalgas incluidas. En el caso de los ingredientes incluidos que no fueron producidos

en la propia empresa (probióticos y “pre-mix” vitamínico), los porcentajes de inclusión fueron calculados con base en los datos de composición proximal de tales productos provistos por los fabricantes.

Con el objetivo de obtener una formulación final más refinada, fue consultada la composición proximal de un producto de enriquecimiento de alimento vivo ampliamente comercializado en forma de emulsión lipídica (tipología del producto líquida). A partir de esos datos, fue realizada una comparativa entre las características de uno de los potenciales competidores en el mercado con respecto al producto en desarrollo, y los requisitos teóricos de larvas de peces marinos previamente recogidos.

Ante las diferencias observadas en la composición proximal teórica de la versión inicial del producto con respecto al producto comercial, se decidió descartar ambas formulaciones teóricas iniciales. En su lugar, se plantearon otras dos nuevas formulaciones definitivas con mayor inclusión de lípidos y probióticos que recibieron el nombre de “ALLarvae 2.0” en el caso de la versión principal, y “ALLarvae 2.0 POC” en el caso de la versión que incluye *Porphyridium cruentum* en su composición (Tabla 4). En su caso, la formulación teórica propuesta se realizó de acuerdo con los requisitos mínimos de las larvas de peces marinos, a la vez que las proporciones de lípidos esenciales para el desarrollo de las larvas se optimizaron para asemejarse en mayor medida a los valores del producto control.

**Tabla 4:** Presencia o ausencia de ingredientes en las diferentes formulaciones piloto ALLarvae.

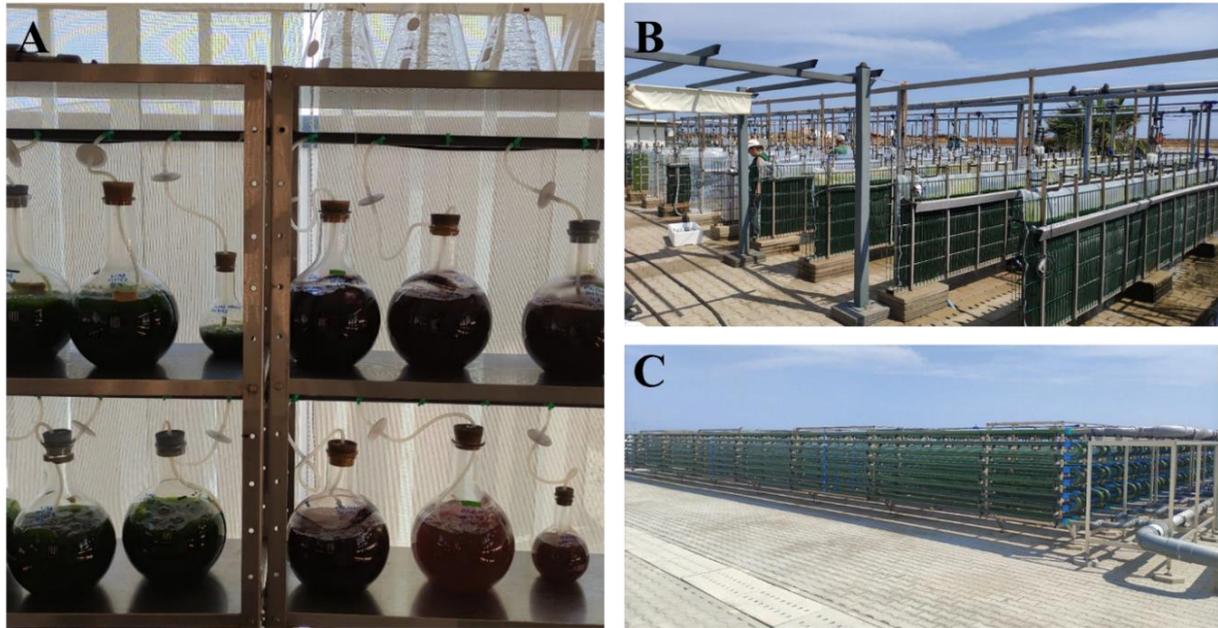
<b>Formulaciones ALLarvae</b>				
<b>Ingredientes</b>	<b>ALLarvae 1.0</b>	<b>ALLarvae 1.0 POC</b>	<b>ALLarvae 2.0</b>	<b>ALLarvae 2.0 POC</b>
Microalgas	X	X	X	X
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	X	X	X	X
Probióticos	X	X	X	X
Vitaminas	X	X	X	X
<i>Porphyridium cruentum</i>		X		X

### **3.2.- PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE BIOMASA MICROALGAL PARA LA ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES DESARROLLADAS DE UN NUEVO PRODUCTO DE ENRIQUECIMIENTO DE ALIMENTO VIVO**

#### **3.2.1.- Método de producción industrial de microalgas y procesamiento de la biomasa**

La producción de la biomasa empleada en las formulaciones fue realizada mediante la metodología de escalado industrial establecida previamente en la empresa Necton S.A. Así, las diferentes especies de

microalgas empleadas fueron inoculadas inicialmente en balones de 5L en el laboratorio (Fig. 1A). A continuación, dichos cultivos fueron transferidos a paneles de cultivo vertical (“green walls”) con un volumen de 1.000L (Fig. 1B), y finalmente se inocularon fotobiorreactores tubulares de tipo “flowthrough” con un volumen de 19.000L y en un régimen de cultivo semicontinuo (Fig. 1C).



**Figura 1:** Instalaciones y método de escalado de producción industrial de microalgas de la empresa Necton S.A. A) Sala de inóculos con balones de 5L. B) Paneles de cultivo verticales de 1.000L (“green walls”). C) Fotobiorreactores tubulares de tipo “flowthrough” de 19.000L.

Una vez se produjo la recolección desde los fotobiorreactores, la biomasa fue introducida en una centrífuga industrial (GEA Westfália®; Alemania) para concentrarla. Seguidamente, dicha biomasa fue procesada por un método de liofilización de tipo “freeze-dried”. Posteriormente, la biomasa liofilizada fue molida para resultar en un polvo fino de granulometría reducida, y finalmente se procedió a su embalaje al vacío.

### 3.2.2.- Método de preparación y embalaje de las formulaciones desarrolladas

Las diferentes versiones piloto propuestas para el producto de enriquecimiento vivo fueron obtenidas a través de la adición de los diferentes ingredientes, en las proporciones establecidas previamente en la formulación. Para conseguir un producto homogéneo, las versiones piloto fueron producidas en cantidades reducidas (1Kg) y mezcladas mediante agitación manual durante 3 minutos. Durante el proceso de adición de los diferentes ingredientes, se introdujeron en primer lugar aquellos con proporciones más reducidas, y además, fueron realizadas agitaciones intermedias para conseguir una mayor dispersión de cada uno de los ingredientes. Asimismo, debido a la mayor granulometría y presencia de cristales en el “pre-mix” vitamínico, este ingrediente fue previamente cribado a través de un tamiz antes de su adición junto con el resto de ingredientes.

Finalmente, una vez comprobado que los ingredientes se hallaban distribuidos homogéneamente, las formulaciones fueron introducidas en bolsas resellables de aluminio y selladas al vacío. De esta manera, las formulaciones fueron protegidas de la incidencia de factores como la luz, el oxígeno o la humedad para evitar la oxidación lipídica y proteica del producto (Hedegaard & Skibsted, 2013). Las bolsas fueron conservadas en refrigeración constante desde su producción ( $\approx 5^{\circ}\text{C}$ ) o en congelación en su defecto ( $\approx -10^{\circ}\text{C}$ ). Para confirmar que el producto pudiera ser congelado, se verificó previamente esa posibilidad con los fabricantes de los ingredientes de origen externo.

### **3.3.- ANÁLISIS DE LAS FORMULACIONES DESARROLLADAS PARA ENRIQUECIMIENTO DE ALIMENTO VIVO Y UN PRODUCTO COMERCIAL CONTROL**

#### **3.3.1.- Análisis de composición proximal de las formulaciones de enriquecimiento**

Fueron enviadas muestras de las formulaciones iniciales (ALLarvae 1.0 y ALLarvae 1.0 POC) y definitivas (ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC) del producto en desarrollo para la realización de diferentes análisis a cargo de la empresa externa Microal (Grupo Tecoal, Sevilla, España). Asimismo, fueron enviadas muestras del producto comercial control para confirmar los datos establecidos por el fabricante.

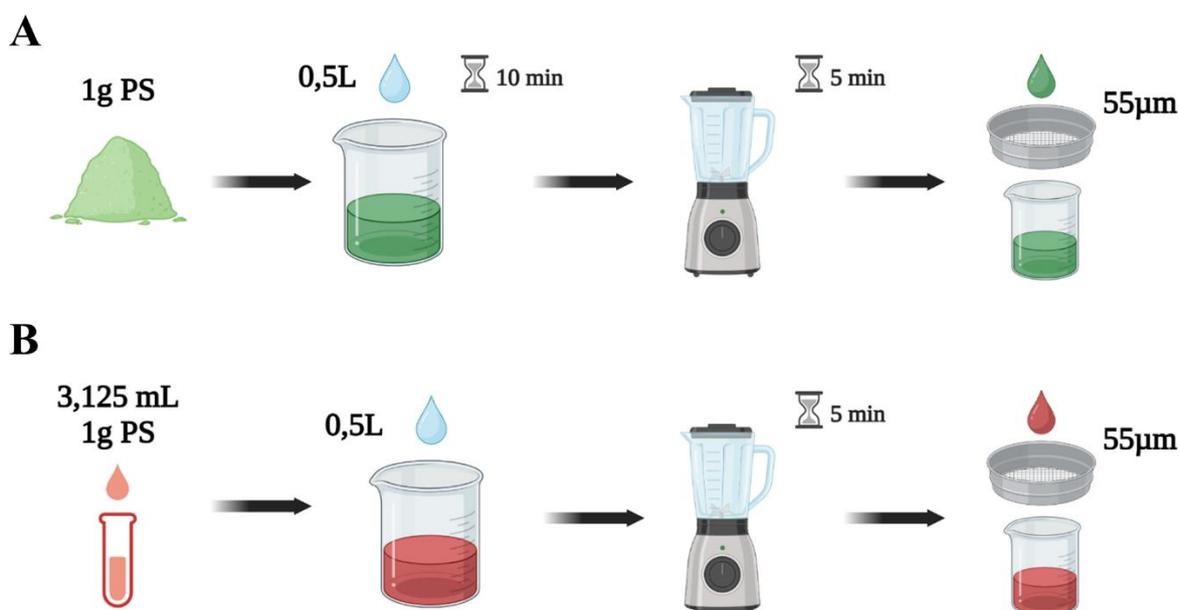
Tanto para las diferentes formulaciones ALLarvae como para el producto control, se realizaron análisis relativos a la composición proximal (porcentajes de proteínas, lípidos y carbohidratos), las características microbiológicas de las formulaciones (presencia de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, bacterias de los géneros *Vibrio* sp., *Enterobacter* sp. o *Salmonella* sp. y de la especie *Escherichia coli*) y a la presencia de metales pesados en su composición (mercurio, cadmio, plomo y arsénico).

#### **3.3.2.- Elaboración de rectas de calibración de las formulaciones desarrolladas y del producto comercial control**

Para la realización de los subsecuentes análisis de suspensión, fue necesario realizar primeramente rectas de calibración para para cada una de las formulaciones propuestas y el producto comercial control. Para ello, fueron preparadas soluciones madre para cada una de las formulaciones de enriquecimiento y el producto control.

La metodología de preparación de las diferentes réplicas biológicas aplicada al realizar las soluciones madre, así como en el resto de análisis realizados posteriormente, fue aquella previamente establecida en la empresa Necton S.A. En el caso de las diferentes formulaciones ALLarvae, 1g de peso seco producto fue introducido en 0,5L de agua salada (35ppt) previamente autoclavada (Fig. 2A). Seguidamente, debido a la tipología en polvo del producto, el producto fue hidratado durante 10 minutos (Fig. 2A). A continuación, se mezcló con una batidora de vaso a velocidad mínima durante 5 minutos y la preparación obtenida fue finalmente cribada por un filtro de malla de  $55\mu\text{m}$  (Fig. 2A). Por otro lado,

la preparación del producto control se realizó con base en la misma metodología, con la excepción de que no fue necesario aplicar el tiempo de hidratación previo debido a la tipología líquida del producto (Fig. 2B). Asimismo, fue necesario calcular en primer lugar el volumen de producto correspondiente a 1g de peso seco de producto (3,125mL), utilizando una balanza de humedad (A&D Instruments, Reino Unido) (Fig. 2B).



**Figura 2:** Metodología de elaboración de réplicas biológicas para las formulaciones piloto ALLarvae (A) y del producto comercial control (B) para la realización de las rectas de calibración de los productos y de los consiguientes análisis.

A partir de las soluciones madre elaboradas, se realizaron varias diluciones seriadas con el objetivo de abarcar el rango de aplicación de los productos en los tanques de enriquecimiento de alimento vivo. A continuación, se midió la densidad óptica de dichas diluciones, cuyas concentraciones eran conocidas previamente, mediante espectrofotometría (Shimadzu UV-mini 1240 Kyoto, Japón) con longitudes de onda de 540nm y 750nm. Así, con la elaboración de dichas rectas de calibración, se permitió que los valores obtenidos por espectrofotometría para esas longitudes de onda fueran correlacionados directamente con la concentración (g/L) de los productos en la columna de agua.

### 3.3.3.- Análisis de suspensión de los productos en la columna de agua

Para cuantificar la suspensión de los productos en la columna de agua se introdujeron 250mL de las preparaciones realizadas previamente en pequeños balones con un volumen de 250mL. A continuación, se realizó la medición de la concentración de los productos en la columna de agua mediante espectrofotometría a longitudes de onda de 540nm y 750nm (t=0h). Los balones fueron dejados en reposo durante 24 horas para evaluar la decantación a lo largo del tiempo de los productos en cuestión. Una vez transcurridas las 24 horas, se realizó la medición por espectrofotometría a longitudes de onda de 540nm y 750nm nuevamente (t=24h). Finalmente, los valores obtenidos en ambos puntos temporales

fueron comparados con las rectas de calibración establecidas previamente para los productos correspondientes, cuantificando el grado de suspensión de éstos en la columna de agua.

### **3.3.4.- Análisis de precipitación de los productos en la columna de agua**

Para cuantificar la precipitación en la columna de agua de los productos, se introdujeron 12mL de las preparaciones realizadas previamente para cada uno de los productos en tubos Falcon® con un volumen de 15mL. Todas las réplicas realizadas fueron dejadas en reposo en vertical a lo largo de 24 horas. Una vez cumplido el tiempo de reposo, se realizó la medición de la altura del “*pellet*” precipitado al fondo del tubo con un paquímetro, estableciendo así el grado de precipitación para cada uno de los productos en cuestión.

### **3.3.5.- Análisis de aglomeración de microalgas en los productos**

Para la cuantificación de los aglomerados de microalgas, y su nivel de incidencia en las formulaciones propuestas para el producto ALLarvae, el procedimiento llevado a cabo se realizó en consonancia con la metodología establecida previamente en la empresa para evaluar la aglomeración en otros productos con la misma tipología. Debido a la naturaleza del producto control (emulsión lipídica), se descartó realizar estos análisis debido a la imposibilidad de llevar a cabo la metodología ya establecida.

De esta manera, para la evaluación de los aglomerados se emplearon las mismas preparaciones utilizadas en el resto de análisis de los productos. Así, se tomaron 10µL de cada una de las réplicas para posteriormente realizar fotografías microscópicas (n=30) mediante el software Zeiss ZEN 3.7 (Lite Edition). A partir de las fotografías realizadas, el conteo de aglomerados en cada una de las instantáneas y la medición de su tamaño fueron realizados mediante el software Zeiss ZEN 3.7 (Lite Edition). Asimismo, se realizaron conteos celulares de cada una de las fotografías mediante el software de procesamiento fotográfico ImageJ.

Para realizar el cálculo de la incidencia y porcentaje de aglomerados en cada una de las fotografías se realizó a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ aglomerados} = \frac{\text{Número de aglomerados en una fotografía} \cdot 100}{\text{Número total de células en una fotografía}}$$

### **3.3.6.- Análisis de parámetros químicos de los productos: nitratos y amonio**

En primer lugar, 20mL de las preparaciones de los productos realizadas previamente fueron introducidas en tubos Falcon® y centrifugadas a una velocidad de 40.000rpm durante 10 minutos. Posteriormente, el sobrenadante obtenido fue recogido y filtrado con jeringas a través de filtros de nylon con un tamaño de malla de 0,22µm.

Para la cuantificación de nitratos, se realizaron preparaciones añadiendo 0,5mL del sobrenadante filtrado junto con 9,3mL de solución de NaCl (35 g/L) y 0,2mL de solución de HCl (1M). Asimismo, el blanco

de muestra fue realizado añadiendo 9,8mL de solución de NaCl (35 g/L) y 0,2mL de solución de HCl (1M). Finalmente, se realizaron mediciones por espectrofotometría a longitudes de onda de 220nm y 275nm. Los resultados obtenidos fueron comparados con la recta de calibración establecida previamente en la empresa, que correlaciona los valores obtenidos mediante espectrofotometría con los valores de nitratos (mM) presentes en las muestras analizadas.

Para la cuantificación de amonio, se empleó el kit comercial Spectroquant® Ammonium Reagent Kit Test (Merck, Alemania) especializado para la medición de este parámetro. Al igual que en la medición de nitratos, las muestras empleadas para los análisis efectuados fueron los sobrenadantes previamente filtrados para evitar inferencias colorimétricas en las posteriores mediciones. Tras añadir los agentes reactivos del kit en el orden indicado por el fabricante, se realizaron mediciones mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 690nm. Los resultados obtenidos de las mediciones fueron comparados con la recta de calibración establecida previamente por la empresa, que correlaciona dichas mediciones con los valores de amonio (mg/L) presentes en las muestras analizadas.

### **3.3.7.- Análisis de cuantificación bacteriana en los productos**

Fueron realizados análisis de cuantificación bacteriana totales del producto comercial control y en las formulaciones definitivas desarrolladas ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC. Para ello, fueron empleados dos medios de cultivo no selectivos: “Tryptone Soy Agar” (TSA, 40g/L) (AppliChem GmbH, Alemania) y “Plate Count Agar” (PCA, 23,5 g/L) (Scharlab, España). Adicionalmente, fue utilizado el medio de cultivo “Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa” (TCBS, 88 g/L) (VWR, Bélgica), especialmente indicado para el crecimiento de bacterias de la familia Vibrionaceae, debido a la importancia de este tipo de bacterias en el ámbito de la patología en acuicultura (Sanches-Fernandes et al., 2022).

La metodología seguida para elaborar las preparaciones que serían plaqueadas fue idéntica a la introducida para el resto de análisis previos (Fig. 2). Una vez obtenida las diferentes preparaciones, se realizaron sucesivas diluciones a partir de la solución madre con agua destilada autoclavada, de acuerdo con las UFC esperadas después de la incubación (1:10 a 1:100). Las placas de cultivo fueron inoculadas con 100µL de volumen de las muestras en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar. Posteriormente fueron incubadas en una estufa a una temperatura de 30°C durante 48 horas en el caso del medio TCBS, y 72 horas en el caso de los medios PCA y TSA, de acuerdo con la normativa de microbiología en la cadena alimentaria UNE-EN ISO-4833-1 (UNE, 2014). Después del tiempo de incubación indicado, se realizaron los contajes en el caso de que el número de UFC se encontrara entre 30 y 300. En caso contrario, las placas se declararon como incontables o no significativas.

### **3.3.8.- Análisis de identificación de estirpes bacterianas en los productos**

A partir de las placas incubadas para los análisis de cuantificación bacteriana en los productos, se seleccionaron las colonias más abundantes y algunas colonias consideradas de interés (p.e. colonias atribuidas por sus características morfológicas a bacterias probióticas). Seguidamente, se cuantificó la abundancia relativa de las colonias seleccionadas en comparación con el resto de colonias observadas en las placas incubadas.

A continuación, las colonias seleccionadas fueron aisladas en nuevas placas de cultivo bacteriano e incubadas en medio TSA durante 72 horas y en medio TCBS durante 48 horas. Para realizar la identificación de las estirpes bacterianas previamente aisladas mediante el procedimiento indicado, fueron empleados sistemas de identificación miniaturizados API® (Analytical Profile Index) basados en la realización de diferentes test bioquímicos. Las colonias fueron resuspendidas de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante, y posteriormente inoculadas en condiciones estériles (en una cámara de flujo laminar) en tres tipos diferentes de galerías API® (Biomérieux, Francia): API®20E, indicadas para la identificación de bacilos Gram negativos; API®20NE, indicadas para la identificación de bacilos Gram negativos no entéricos; y API®50CHB/E, indicadas para la identificación de bacterias del género *Bacillus* y bacilos Gram negativos de las familias Enterobacteriaceae y Vibrionaceae. Las diferentes galerías API® inoculadas fueron incubadas en una estufa a 33°C durante 24 horas. Los resultados observados fueron registrados e introducidos en la base de datos APIWeb® (Biomérieux, Francia) para obtener la identificación correspondiente.

### **3.4.- DESARROLLO DEL PROTOCOLO DE APLICACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE DOSIS PARA EL NUEVO PRODUCTO DESARROLLADO**

#### **3.4.1.- Elaboración de un protocolo y dosis de aplicación iniciales**

Para elaborar una versión inicial del protocolo de aplicación y las correspondientes dosis se tomó como modelo el protocolo del producto comercial control (Anexo I). Basándose en la información otorgada por el fabricante del producto control, se establecieron inicialmente dos dosis de aplicación para la formulación desarrollada, una dosis inicial y una segunda de refuerzo para mantener un adecuado perfil nutricional del alimento vivo antes de su introducción en los tanques larvarios. De acuerdo con la observación visual de la cantidad de producto ingerida por los rotíferos, así como con análisis de espectrofotometría del agua para calcular la permanencia del producto en el agua a lo largo del enriquecimiento, se establecieron las cantidades y horas de aplicación iniciales para cada una de las dosis.

De esta manera, la primera dosis para enriquecimiento de rotíferos sería aplicada con una cantidad de 0,2 g/L durante un tiempo de 13 horas (Anexo I). Al fin de las 13 horas, la segunda dosis sería aplicada con una cantidad de 0,1 g/L durante 3 horas (Anexo I). En resumen, se estableció que el protocolo inicial

para el enriquecimiento de rotíferos con una densidad de cultivo en torno a 800 rotíferos/mL tuviera una duración de 16 horas para un adecuado enriquecimiento del alimento vivo (Anexo I).

Para su aplicación en enriquecimiento de artemia se mantuvieron los tiempos establecidos en el protocolo de rotíferos, mientras que las cantidades aplicadas fueron incrementadas (Anexo I). El aumento de las dosis establecidas se propuso con base en las necesidades más elevadas de alimento para un correcto enriquecimiento en densidades de cultivo entre 200 y 300 artemias/mL. Consecuentemente, el protocolo inicial elaborado para enriquecimiento de artemia consistió en una primera dosis aplicada con una cantidad de 1,2 g/L durante 13 horas, y una segunda dosis de refuerzo aplicada con una cantidad de 0,6 g/L durante 3 horas (Anexo I).

### 3.4.2.- Verificación del grado de enriquecimiento del alimento vivo (rotíferos) con las nuevas formulaciones desarrolladas

Debido a la necesidad de reducir el coste diario de aplicación para su posterior comercialización, se acordó que las cantidades aplicadas del producto fueran reducidas, e incluso intentar retirar las dosis de refuerzo sin afectar en gran medida el perfil bioquímico del alimento vivo enriquecido. Para tener datos más certeros como base en los cuales establecer el protocolo definitivo, se enviaron muestras de rotíferos enriquecidos al grupo de investigación MarBiotech (Centro de Ciências do Mar, Universidade do Algarve). Así, se analizó el perfil lipídico de los rotíferos enriquecidos con el producto ALLarvae a lo largo de 16 horas (tiempo de duración del protocolo inicial de aplicación del producto) (Tabla 5).

**Tabla 5:** Puntos temporales de recogida de los rotíferos enriquecidos con las formulaciones piloto ALLarvae para verificar el porcentaje de lípidos de su perfil nutricional. En las observaciones se detallan las dosis y los puntos temporales en los que fueron aplicadas.

Puntos de muestreo	Observaciones
t=0	Aplicación inicial del enriquecimiento con una dosis de 0,2 g/L
t=3	--
t=6	--
t=8	--
t=13	Aplicación de segunda dosis de refuerzo con una cantidad de 0,1 g/L
t=16	Fin del enriquecimiento de rotíferos

### 3.4.3.- Elaboración de un protocolo y dosis de aplicación definitivos

Con base en los análisis del perfil bioquímico de los rotíferos enriquecidos a lo largo de un período de enriquecimiento, fueron modificadas las dosis y tiempos de aplicación del protocolo inicial. De esta forma, se planteó un protocolo definitivo que facilitaba la aplicación del producto en términos logísticos al reducirse el tiempo de aplicación, asemejándose en mayor medida al protocolo del producto control. Asimismo, con la reducción de las dosis diarias, el coste diario de aplicación del producto también fue reducido.

Así, el protocolo de aplicación definitivo para el producto ALLarvae para enriquecimiento de rotíferos quedó definido como una única dosis de aplicación de 0,3 g/L durante 6 horas (Tabla 6). Por otro lado, el protocolo final designado para enriquecimiento de artemia con el producto ALLarvae consistió en una primera dosis de aplicación de 0,6 g/L durante 6 horas, y una segunda dosis de refuerzo de 0,6 g/L durante 6 horas. En ambos casos, el producto siempre es hidratado durante 10 minutos en agua del sistema en el que va a ser aplicado, mezclado en una batidora de vaso a velocidad mínima durante 5 minutos, y finalmente filtrado por una malla de 55µm, de acuerdo con las recomendaciones de la empresa Necton S.A. para sus productos en polvo.

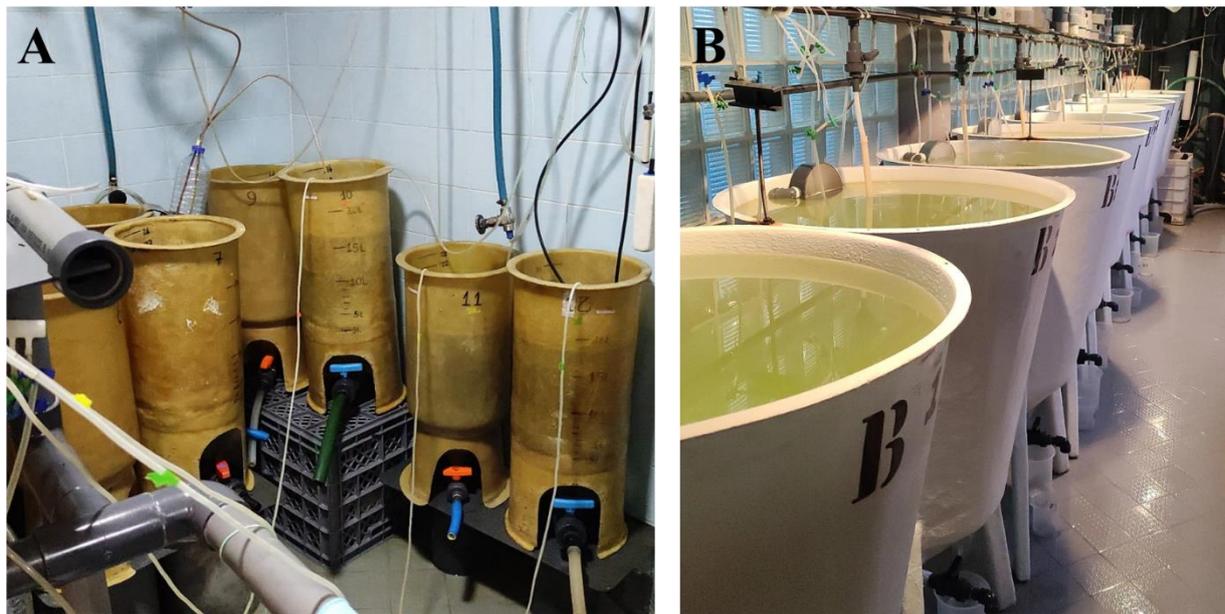
**Tabla 6:** Protocolo de aplicación y dosis definitivas de las formulaciones piloto ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC para enriquecimiento de rotíferos y artemia.

<b>PROTOCOLO DE APLICACIÓN DE LAS FORMULACIONES ALLARVAE PARA ENRIQUECIMIENTO DE ALIMENTO VIVO</b>		
<b>ROTÍFEROS</b>		
	<b>1ª dosis</b>	<b>2ª dosis</b>
<b>Tiempo de enriquecimiento</b>	6h	--
<b>Cantidad</b>	0,3 g/L	--
<b>ARTEMIAS</b>		
	<b>1ª dosis</b>	<b>2ª dosis</b>
<b>Tiempo de enriquecimiento</b>	6h	6h
<b>Cantidad</b>	0,6 g/L	0,6 g/L

### 3.5.- ENSAYO “*IN VIVO*” DEL PRODUCTO DE ENRIQUECIMIENTO DE ALIMENTO VIVO EN CULTIVO LARVARIO DE DORADA (*Sparus aurata*)

#### 3.5.1.- Diseño experimental y cultivo larvario de dorada (*Sparus aurata*)

El enriquecimiento del alimento vivo (rotíferos y artemias) y el cultivo de larvas de dorada (*Sparus aurata*) se desarrollaron durante 37 días en la Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), perteneciente al Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) (Fig. 3A & 3B). El calendario y eventos planificados durante el cultivo larvario se encuentran detallados en profundidad en el Anexo II.



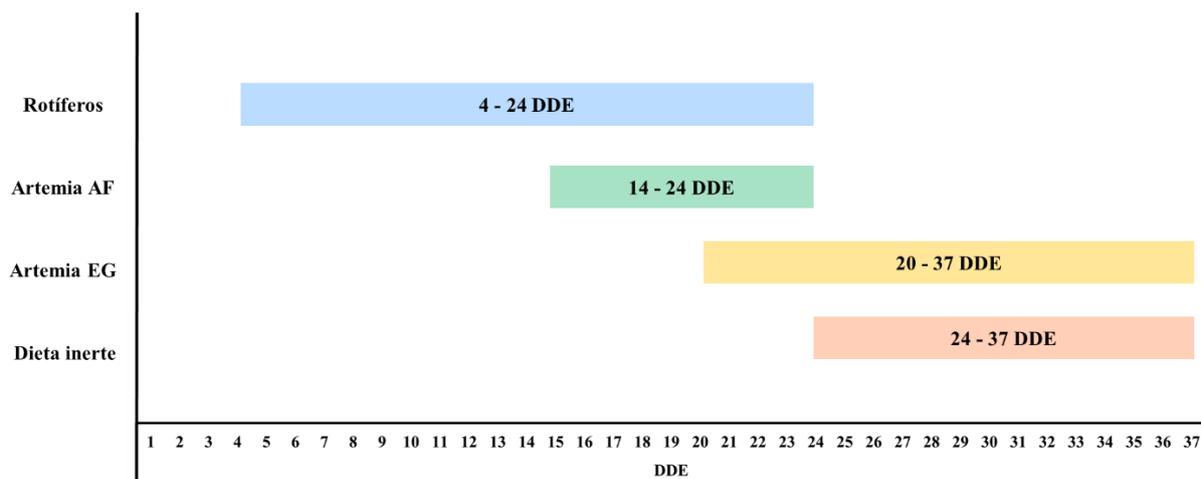
**Figura 3:** Instalaciones de la EPPO con tanques de 16L de enriquecimiento de presas vivas (rotíferos y artemias) (A) y tanques de 200L de cultivo larvario de dorada (*Sparus aurata*) (B).

Los cultivos auxiliares se realizaron en 6 tanques de cultivo (3 para cultivo rotíferos y 3 para cultivo de artemias) con un volumen de 16L (Fig. 3A). La aplicación de los productos de enriquecimiento se realizó en consonancia con los protocolos descritos anteriormente para el producto control y las dos formulaciones ALLarvae empleadas (Anexo I; Tabla 6). Los rotíferos (*Brachionus* sp.) fueron cultivados en densidades de 800 rotíferos/mL. Por su parte, los nauplios (AF) y metanauplios (EG) de artemias (*Artemia franciscana*, INVE Aquaculture®, Bélgica) fueron cultivados en densidades comprendidas entre las 200 y las 300 artemias/mL.

Para el cultivo de larvas de dorada fueron empleados 9 tanques con un volumen de 200L en sistema abierto, con entrada de agua por el fondo, salida de agua por la superficie, aireamiento suave y un fotoperíodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad (Fig. 3B). La distribución de los tanques fue realizada de manera aleatoria, tal y como se refleja en el Anexo III, asignándose 3 tanques de cultivo larvario para cada uno de los tratamientos (Control, ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC). Inicialmente, se introdujeron 15.100 larvas de dorada recién nacidas en cada uno de los tanques, con una densidad de

75,5 larvas/L, procedentes de una puesta natural en los tanques de reproductores de la EPPO con condiciones controladas.

Las larvas fueron alimentadas de acuerdo con el protocolo establecido en la Fig. 4. Así, los rotíferos fueron suministrados entre el día 4 DDE (después de la eclosión) hasta el día 24 DDE (Fig. 4). Las artemias de tipo AF (nauplios) fueron suministradas entre los días 15 DDE y 24 DDE, mientras que las artemias de tipo EG (metanauplios) fueron suministradas desde el día 20 DDE hasta el final del ensayo (Fig. 4). La dieta inerte (Caviar<sup>®</sup>, Bernaqua, Bélgica) fue suministrada a partir del día 24 DDE (Fig. 4), y su introducción supuso una reducción gradual en el suministro de artemia. La alimentación con presas vivas o dieta inerte se realizó diariamente a lo largo de todo el ensayo, suministrando entre 3 y 4 dosis de alimentación cada día.



**Figura 4:** Protocolo de alimentación establecido para el cultivo de larvas de dorada (*Sparus aurata*) con presas vivas enriquecidas y dieta inerte desde la apertura de la boca (4 DDE) hasta el fin del ensayo (37 DDE).

Durante el cultivo larvario fueron realizadas adicionalmente tareas diarias de limpieza del fondo de los tanques, control del flujo del agua garantizando una renovación estable y semejante entre los diferentes tanques, limpieza de los filtros de salida del agua y aplicación de la técnica de agua verde con microalgas vivas (entre 2 y 3 veces por día).

### 3.5.2.-Análisis de parámetros de calidad del agua de los tanques de cultivo larvario

En relación con los parámetros de calidad del agua, fueron realizadas mediciones diarias de la temperatura y oxígeno disuelto en el agua de los tanques de cultivo larvario. Ambos parámetros fueron determinados con las correspondientes sondas de medición. Adicionalmente, se realizaron mediciones tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes) de nitratos, amonio y pH. En el caso de las mediciones de los valores de pH también fue empleada la correspondiente sonda de medición.

Para la cuantificación de nitratos en el agua, se realizaron las correspondientes preparaciones con 0,5mL del agua de los tanques de cultivo larvario junto con 9,3mL de solución de NaCl (35 g/L) y 0,2mL de

solución de HCl (1M). Asimismo, el blanco de muestra fue realizado añadiendo 9,8mL de solución de NaCl (35 g/L) y 0,2mL de solución de HCl (1M). Finalmente, se realizaron mediciones por espectrofotometría a longitudes de onda de 220nm y 275nm. Los resultados obtenidos fueron comparados con la recta de calibración establecida previamente en la empresa, que correlaciona los valores obtenidos mediante espectrofotometría con los valores de nitratos (mM) presentes en las muestras analizadas.

Para la cuantificación de amonio, se empleó el kit comercial Spectroquant® Ammonium Reagent Kit Test (Merck, Alemania) especializado para la medición de este parámetro. Al igual que en la medición de nitratos, las muestras empleadas para los análisis efectuados fueron las muestras de agua de los tanques previamente recogidas. Tras añadir los agentes reactivos del kit en el orden indicado por el fabricante, se realizaron mediciones mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 690nm. Los resultados obtenidos de las mediciones fueron comparados con la recta de calibración establecida previamente por la empresa, que correlaciona dichas mediciones con los valores de amonio (mg/L) presentes en las muestras analizadas.

#### **3.5.4.- Análisis de cuantificación bacteriana del agua de los tanques de enriquecimiento de alimento vivo (rotíferos), agua de los tanques de cultivo larvario y del tracto digestivo de larvas de dorada (*Sparus aurata*)**

A lo largo del ensayo, fueron establecidos diferentes puntos de muestreo donde se recogieron muestras del agua de los tanques de enriquecimiento de rotíferos, del agua de los tanques de cultivo larvario y muestras de las larvas cultivadas (n=15 larvas/tanque). Dichos puntos de muestreo fueron establecidos en el día 15 DDE para la cuantificación bacteriana en el agua de los tanques de enriquecimiento de los rotíferos; los días 3 DDE y 15 DDE para la cuantificación bacteriana en el agua de los tanques de cultivo larvario; y en los días 15 DDE, 24 DDE y 33 DDE para la cuantificación bacteriana en el tracto digestivo de las larvas.

Debido a la incidencia de eventos de mortalidad masiva en los días 17 DDE y 19 DDE, fueron aplicados antibióticos en los tanques de cultivo larvario a partir del día 18 DDE. Consecuentemente, en el punto de muestreo establecido para los análisis del día 24 DDE aún se estaba suministrando antibióticos. Los baños de antibióticos fueron realizados por la mañana durante un período de 2 horas sin renovación del agua. La utilización del antibiótico no alteró el protocolo de alimentación establecido para las larvas, de modo que fueron alimentadas normalmente durante esos días. El fin de la aplicación de antibióticos fue establecido el día 26 DDE. Debido a que la recuperación de la microbiota habitual del tracto gastrointestinal de larvas de peces demora entre 5 y 10 días después de la aplicación de antibióticos (Payne et al., 2022), los resultados obtenidos en el punto de muestreo del día 33 DDE fueron utilizados para establecer una comparación con la cuantificación obtenida en el punto de muestreo del día 24 DDE (aún durante la aplicación de antibióticos).

Para el plaqueo de las muestras fueron empleados el medio de cultivo no selectivo “Tryptone Soy Agar” (TSA, 40g/L) (AppliChem GmbH, Alemania), y el medio de cultivo “Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa” (TCBS, 88 g/L) (VWR, Bélgica), especialmente indicado para el crecimiento de bacterias de la familia Vibrionaceae.

Por una parte, para el plaqueo del agua de los tanques de enriquecimiento de rotíferos se realizaron sucesivas diluciones con agua destilada autoclavada de acuerdo con las UFC esperadas después de la incubación (1:10 a 1:1.000), y fue plaqueado un volumen de 200µL por placa en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar. Debido a la disponibilidad de material, sólo fueron plaqueadas muestras de los tratamientos ALLarvae 2.0 y del producto control en placas con medio de cultivo TSA. En el caso del agua de los tanques de cultivo larvario, se realizaron sucesivas diluciones con agua destilada autoclavada de acuerdo con las UFC esperadas después de la incubación (1:1 a 1:100), y fue plaqueado un volumen de 200µL por placa. Por otro lado, para establecer la cuantificación bacteriana del tracto digestivo de las larvas de dorada, 15 larvas de cada tanque fueron desinfectadas exteriormente mediante lavados en una solución de cloruro de benzoalconio 0,1%, y posteriormente fueron trituradas. A continuación, se realizaron sucesivas diluciones con agua destilada autoclavada de acuerdo con las UFC esperadas después de la incubación (1:1 a 1:100), y fue plaqueado un volumen de 100µL por placa.

Las placas de cultivo inoculadas fueron incubadas en una estufa a una temperatura de 30°C durante 48 horas en el caso del medio TCBS, y 72 horas en el caso del medio TSA, de acuerdo con la normativa de microbiología en la cadena alimentaria UNE-EN ISO-4833-1 (UNE, 2014). Después del tiempo de incubación indicado, se realizaron los contajes en el caso de que el número de UFC se encontrara entre 30 y 300. En caso contrario, las placas se declararon como incontables o no significativas.

### **3.5.5.- Análisis de identificación de estirpes bacterianas en el agua de los tanques de enriquecimiento de alimento vivo (rotíferos) y en el tracto digestivo de larvas de dorada (*Sparus aurata*)**

A partir de las placas incubadas para los análisis de cuantificación bacteriana en los tanques de enriquecimiento de rotíferos, en los tanques de cultivo larvario y en el tracto digestivo de las larvas, se seleccionaron las colonias más abundantes y algunas colonias consideradas de interés (p.e. colonias atribuidas por sus características morfológicas a bacterias probióticas). Seguidamente, se cuantificó la abundancia relativa de las colonias seleccionadas en comparación con el resto de colonias observadas en las placas incubadas.

A continuación, las colonias seleccionadas fueron aisladas en nuevas placas de cultivo bacteriano e incubadas en medio TSA durante 72 horas y en medio TCBS durante 48 horas. Para realizar la identificación de las estirpes bacterianas previamente aisladas mediante el procedimiento indicado, fueron empleados sistemas de identificación miniaturizados API® (Analytical Profile Index) basados en la realización de diferentes test bioquímicos. Las colonias fueron resuspendidas de acuerdo con el

protocolo proporcionado por el fabricante, y posteriormente inoculadas en condiciones estériles (en una cámara de flujo laminar) en tres tipos diferentes de galerías API® (Biomérieux, Francia): API®20E, indicadas para la identificación de bacilos Gram negativos; API®20NE, indicadas para la identificación de bacilos Gram negativos no entéricos; y API®50CHB/E, indicadas para la identificación de bacterias del género *Bacillus* y bacilos Gram negativos de las familias Enterobacteriaceae y Vibrionaceae. Las diferentes galerías API® inoculadas fueron incubadas en una estufa a 33°C durante 24 horas. Los resultados observados fueron registrados e introducidos en la base de datos APIWeb® (Biomérieux, Francia) para obtener la identificación correspondiente.

### **3.5.6.- Supervivencia, crecimiento y desempeño biológico de las larvas de dorada (*Sparus aurata*)**

Con el objetivo de realizar un seguimiento periódico del estado de los peces, se realizó diariamente la recogida y contabilización de las larvas muertas. Para calcular la supervivencia al final del ensayo, fueron contadas todas las larvas restantes en cada uno de los tanques y calculado el porcentaje relativamente al número inicial.

Por otra parte, se establecieron diferentes puntos de muestreo (0 DDE, 3 DDE, 15 DDE, 24 DDE y 37 DDE) para realizar mediciones de la longitud y el peso seco de las larvas. En cada uno de los puntos de muestreo fueron recogidas 20 larvas aleatorias de cada uno de los tanques. La medición de la longitud de las larvas fue realizada a partir de imágenes tomadas con una cámara digital de la marca Optika® (Bérgamo, Italia) instalada en una lupa estereoscópica. Por último, el valor del peso seco fue obtenido al introducir las larvas recogidas en una balanza de humedad (A&D Instruments, Reino Unido). Adicionalmente, en los puntos de muestreo de los días 15 DDE y 24 DDE, se registró el porcentaje de larvas de dorada con vejiga insuflada a partir de las imágenes tomadas para medir la longitud de las larvas.

### **3.6.- ENSAYO DE ESTRÉS POR TRANSPORTE DE LARVAS DE DORADA (*Sparus aurata*) CULTIVADAS CON PRODUCTOS PILOTO Y CONTROL DESPUÉS DEL DESTETE**

#### **3.6.1.- Diseño experimental de supervivencia al estrés por transporte de larvas de dorada (*Sparus aurata*)**

Al finalizar el ensayo “*in vivo*” de cultivo larvario de dorada, fueron recogidas larvas de todos los tanques para realizar un ensayo de estrés por transporte, con el objetivo de simular un evento de desplazamiento real desde un criadero (“*hatchery*”) hasta una instalación de preengorde (“*nursery*”).



**Figura 5:** A) Sacos de transporte de larvas para la simulación del evento de estrés por transporte. B) Detalle del trayecto realizado durante 5 horas desde Olhão hasta Lagos (ida y vuelta, 220Km).

Para ello, fueron preparados 3 sacos de plástico por tanque con 300 larvas en cada saco con 2L de agua (150 larvas/L). Antes de iniciar el transporte, los sacos fueron inyectados con oxígeno para mantener unas condiciones favorables en la medida de lo posible. Finalmente los sacos fueron introducidos en una furgoneta para iniciar el transporte (Fig. 5A). El transporte de las larvas consistió en un viaje de ida y vuelta desde Olhão hasta Lagos, recorriendo una distancia de 220Km y con una duración de aproximadamente 5 horas (Fig. 5B). Al final del trayecto, los sacos de transporte fueron abiertos y se realizó el conteo de larvas supervivientes al transporte.

### 3.6.2.- Análisis de parámetros de calidad del agua de los sacos de transporte

Para descartar la incidencia en la mortalidad de las larvas durante el transporte de algunos de los parámetros de la calidad del agua, fueron registrados los niveles de oxígeno disuelto y pH antes y después del desplazamiento, al igual que se registró la temperatura a tiempo real durante el trayecto. Asimismo, fueron recogidas muestras del agua antes y después del transporte para realizar mediciones de amonio, con base en la metodología previamente descrita para la medición de este parámetro.

### 3.7.- ANÁLISIS DE DATOS

Se calcularon las medias  $\pm$  desviación estándar a partir de los datos obtenidos en relación con las características de los diferentes productos analizados (suspensión, precipitación, parámetros químicos, aglomeración y cuantificación bacteriana), la verificación del grado de enriquecimiento del alimento vivo para el establecimiento de un protocolo de aplicación adecuado para formulaciones piloto, y de los resultados obtenidos en los ensayos de cultivo larvario y estrés por transporte con larvas de dorada (parámetros de calidad del agua, cuantificación bacteriana y resultados del desempeño biológico de las larvas en ambos ensayos). Para la realización de los análisis estadísticos, los resultados obtenidos fueron analizados con el software estadístico SPSS (IBM; Chicago, EE.UU.). Para establecer si existían diferencias significativas entre las medias de diferentes grupos de datos, se realizaron análisis de distribución t de Student en el caso de que fueran dos grupos de datos a analizar, o análisis ANOVA unifactoriales seguidos de análisis post hoc HSD Tukey en el caso de que fueran más de dos grupos de datos. En todos los casos, un valor  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## 4.- RESULTADOS

### 4.1.- COMPOSICIÓN PROXIMAL Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PRODUCTOS DE ENRIQUECIMIENTO DE ALIMENTO VIVO

#### 4.1.1.- Análisis de composición proximal de las formulaciones de enriquecimiento

Los resultados de los análisis realizados por parte de una empresa externa en relación con la composición proximal de las formulaciones piloto ALLarvae iniciales (ALLarvae 1.0 y ALLarvae 1.0 POC), las formulaciones piloto ALLarvae definitivas (ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC) y del producto comercial control pueden consultarse en la Tabla 7.

El porcentaje de proteínas en las diferentes formulaciones ALLarvae analizadas fue ligeramente menor en las formulaciones con *Porphyridium cruentum* en su composición, tanto en las formulaciones iniciales como las definitivas (Tabla 7). No obstante, el producto control presentó menor porcentaje proteico que cualquiera de las formulaciones ALLarvae analizadas, con una diferencia cerca del 15% de reducción de inclusión proteica (Tabla 7). Por el contrario, la proporción de lípidos fue notablemente superior en el caso del producto control en comparación con las formulaciones piloto desarrolladas, con una diferencia de hasta un 17% respecto a las formulaciones iniciales, y de un 14% respecto a las formulaciones definitivas (Tabla 7). En este sentido, las formulaciones ALLarvae definitivas presentaron porcentajes de lípidos superiores en comparación con las versiones iniciales (Tabla 7). Por otra parte, los valores de cenizas en la composición fueron muy similares entre las formulaciones ALLarvae, y en todos los casos superiores a los porcentajes de cenizas del producto control (Tabla 7).

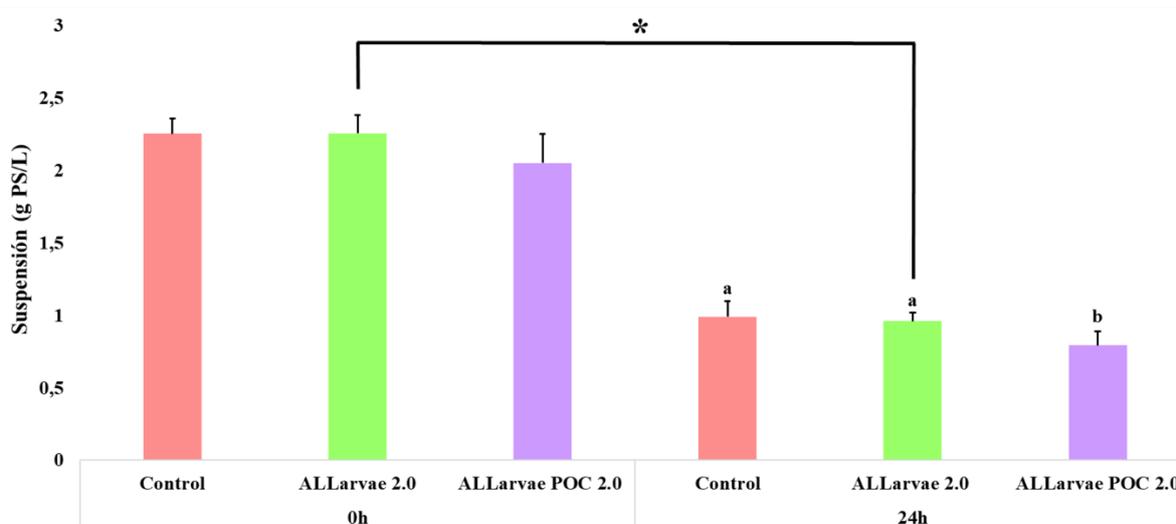
**Tabla 7:** Composición proximal del producto comercial control de enriquecimiento y de las diferentes formulaciones piloto ALLarvae de acuerdo con los análisis realizados por la empresa Microal (Sevilla, España).

Producto	Proteínas (g/100g)	Lípidos (g/100g)	Cenizas (g/100g)
Control	19,3	38	8,3
ALLarvae 1.0	34,6	21,4	14,5
ALLarvae 1.0 POC	34,1	21,2	14,2
ALLarvae 2.0	34,5	24,2	14,1
ALLarvae 2.0 POC	34,1	24,2	14,2

Adicionalmente, la información de los análisis de caracterización microbiológica y de presencia de metales pesados en la composición de las formulaciones piloto ALLarvae y del producto control puede ser consultada en el Anexo IV.

#### 4.1.2.- Análisis de suspensión de los productos en la columna de agua

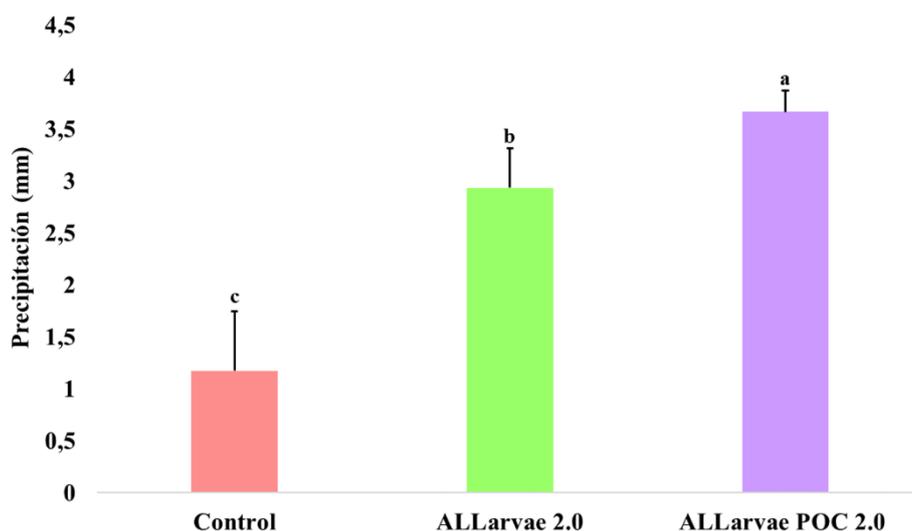
La media de la concentración inicial ( $t=0h$ ) para los diferentes productos se situó entre 2 gPS/L y 2,3 gPS/L, sin diferencias significativas entre los tres tratamientos (Control, ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC). Tras el transcurso de las 24 horas de reposo, no se observaron diferencias significativas en el grado de suspensión entre el producto control ( $0,99 \pm 0,106$  gPS/L) y la formulación ALLarvae 2.0 ( $0,96 \pm 0,061$  gPS/L) (Fig. 6). En cambio, el grado de suspensión de la formulación ALLarvae 2.0 POC fue significativamente inferior tras 24 horas en comparación con las dos formulaciones alternativas ( $0,79 \pm 0,099$  gPS/L) (Fig. 6).



**Figura 6:** Concentración (gPS/L) del producto control y las formulaciones ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC en la columna de agua en balones de 250mL en  $t=0h$  y  $t=24h$  ( $n=24$  réplicas para cada uno de los tratamientos). Las letras en minúscula denotan diferencias significativas (ANOVA unifactorial; análisis post hoc HSD Tukey;  $p < 0,05$ ). \* denota diferencias significativas entre los puntos temporales  $t=0h$  y  $t=24h$  (análisis de distribución t de Student;  $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3.- Análisis de precipitación de los productos en la columna de agua

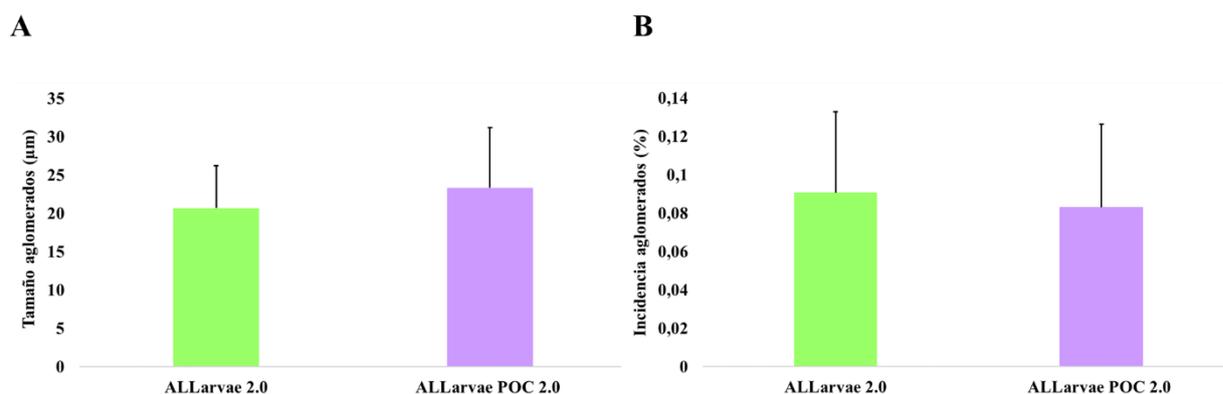
En lo relativo al análisis del grado de precipitación de los productos, se hallaron diferencias significativas entre las tres formulaciones (Control, ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC) tras 24 horas de reposo (Fig. 7). La formulación con depósitos de menor altura fue el producto control ( $1,173 \pm 0,575$  mm) (Fig. 7). A su vez, la formulación ALLarvae 2.0 ( $2,935 \pm 0,379$  mm) presentó depósitos de menor altura que la formulación ALLarvae 2.0 POC ( $3,665 \pm 0,203$  mm) (Fig. 7).



**Figura 7:** Precipitación (mm) del producto control y las formulaciones ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC en la columna de agua en tubos Falcon® de 15mL tras 24 horas (n=60 réplicas para cada uno de los tratamientos). Las letras en minúscula denotan diferencias significativas (ANOVA unifactorial; análisis post hoc HSD Tukey;  $p < 0,05$ ).

#### 4.1.4.- Análisis de aglomeración de microalgas en los productos

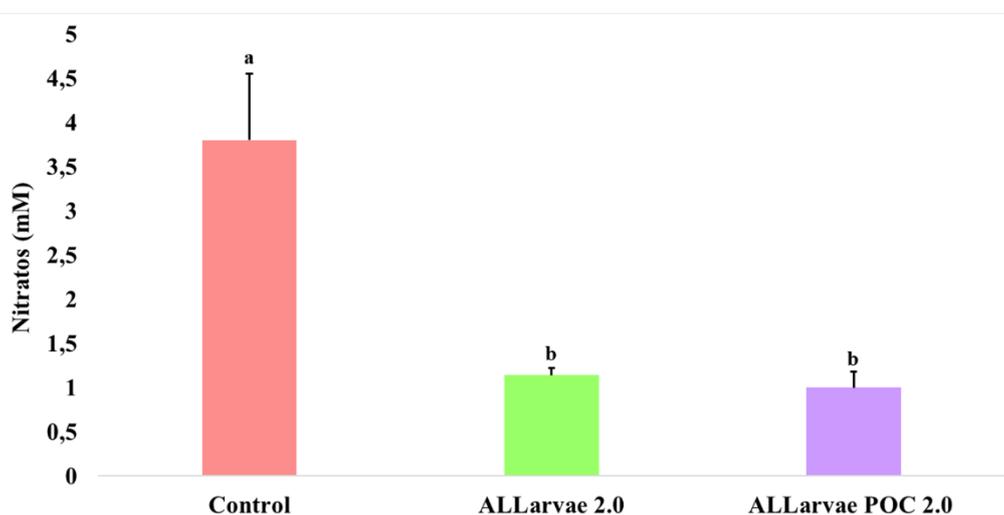
En relación con los aglomerados de microalgas presentes en las formulaciones ALLarvae, no se obtuvieron diferencias significativas en el tamaño ni en el porcentaje de aglomerados presentes en ambas (Fig. 8A & XB). No obstante, se observó una tendencia a un mayor tamaño de los aglomerados en el caso de la versión ALLarvae 2.0 POC ( $23,326 \pm 7,863$  mm) en comparación con la formulación ALLarvae 2.0 ( $20,697 \pm 5,540$  mm) (Fig. 8B).



**Figura 8:** Tamaño de aglomerados de microalgas (A) y su porcentaje de incidencia (B) en las formulaciones ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC (n=30 réplicas para cada uno de los tratamientos) (análisis de distribución t de Student;  $p < 0,05$ ).

#### 4.1.5.- Análisis de parámetros químicos de los productos: nitratos y amonio

En términos de cuantificación de los niveles de nitratos en las formulaciones, en el producto control fueron significativamente superiores en comparación con ambas formulaciones ALLarvae (Fig. 9). Concretamente, el producto control mostró una concentración de nitratos de 3,8mM ( $\pm 0,749$ ) (Fig. 9). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en los niveles de nitratos entre ambas formulaciones ALLarvae analizadas. Así, la concentración de nitratos en la formulación ALLarvae 2.0 fue de 1,141mM ( $\pm 0,083$ ), mientras que en la formulación ALLarvae 2.0 POC fue de 1mM ( $\pm 0,18$ ) (Fig. 9).



**Figura 9:** Concentración de nitratos (mM) en el producto control y en las formulaciones ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC (n=24 réplicas para cada uno de los tratamientos). Las letras en minúscula denotan diferencias significativas (ANOVA unifactorial; análisis post hoc HSD Tukey;  $p < 0,05$ ).

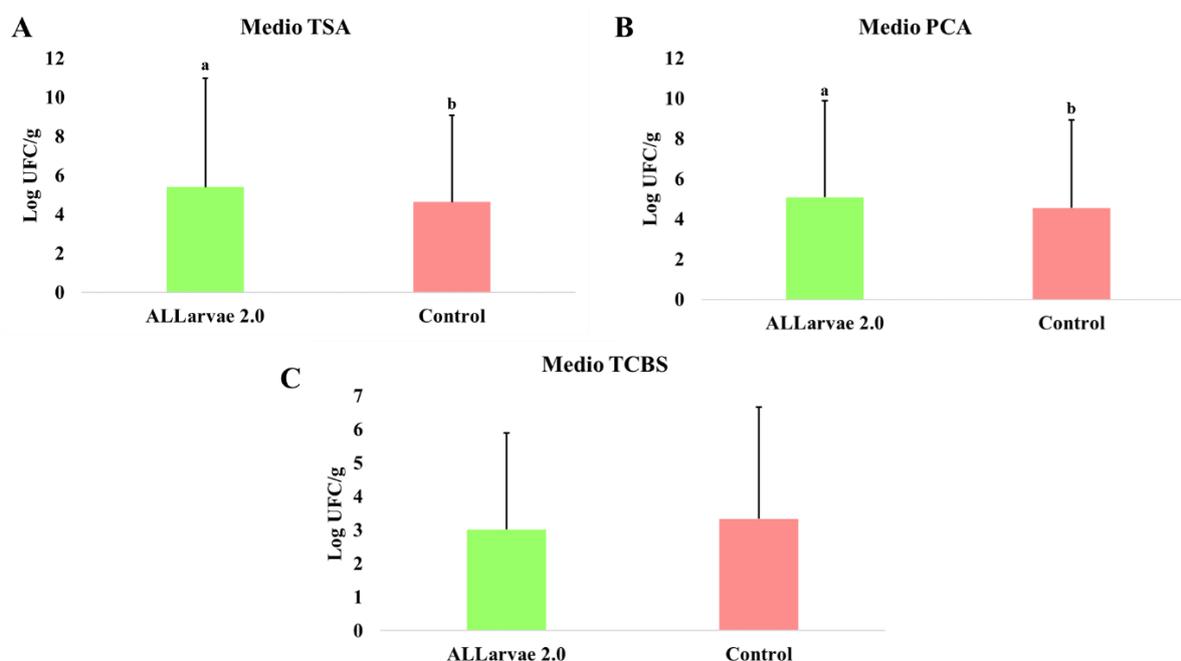
En cuanto a los niveles de amonio, en ninguna de las preparaciones de las de los productos analizados se detectó la presencia de amonio (n=24 réplicas para cada uno de los tratamientos).

#### 4.1.6.- Análisis de cuantificación bacteriana en los productos

Los resultados de cuantificación bacteriana obtenidos en los dos productos analizados difirieron en función del medio de cultivo utilizado. Los datos obtenidos para cada uno de los productos en los medios de cultivo TSA, PCA y TCBS fueron representados gráficamente en escala logarítmica (Fig. 10A, 10B & 10C).

En las placas incubadas con medio TSA, el crecimiento bacteriano fue significativamente mayor en el caso del producto ALLarvae 2.0 ( $243.960 \pm 400.478$  UFC/g) en comparación con el producto control ( $41.538 \pm 28.953$  UFC/g) (Fig. 10A). Por su parte, en las placas incubadas con medio PCA, el crecimiento bacteriano también fue significativamente superior en la formulación ALLarvae 2.0 ( $120.150 \pm 63.980$  UFC/g) con respecto al producto comercial control ( $35.340 \pm 24.526$  UFC/g) (Fig.

10B). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento bacteriano en el medio de cultivo TCBS entre la formulación ALLarvae 2.0 ( $1.026 \pm 757$  UFC/g) y el producto comercial control ( $2.148 \pm 2.121$  UFC/g) (Fig. 10C). No obstante, el producto comercial control presentó una tendencia a un crecimiento bacteriano superior en medio TCBS frente a la formulación piloto ALLarvae 2.0 (Fig. 10C).



**Figura 10:** Cuantificación bacteriana en escala logarítmica (Log UFC/mL) en el producto comercial control y en la formulación ALLarvae 2.0 en medios de cultivo TSA (A), PCA (B) y TCBS (C) (n=24 réplicas para cada tratamiento en cada medio de cultivo). Las letras en minúscula denotan diferencias significativas (análisis de distribución t de Student;  $p < 0,05$ ).

#### 4.1.7.- Análisis de identificación de estirpes bacterianas en los productos

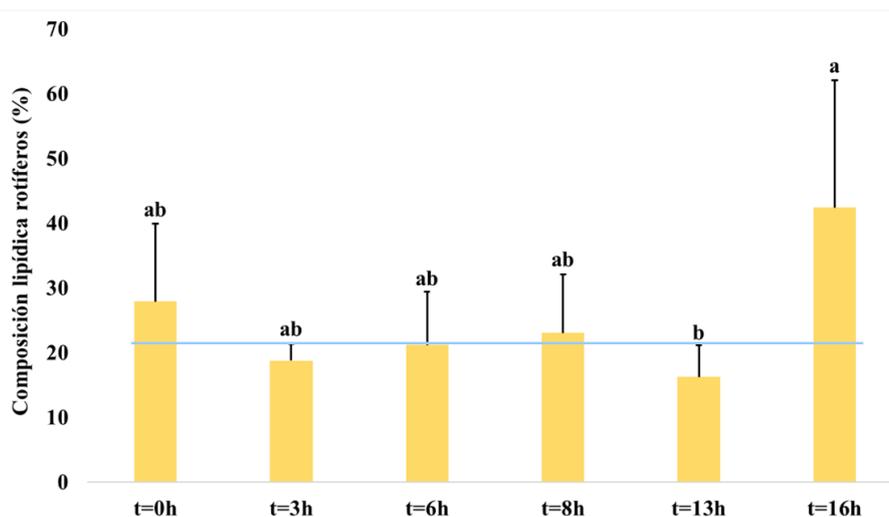
Una de la colonias aisladas en las placas de cultivo correspondientes al producto ALLarvae 2.0 mostró indicios de ser una bacteria probiótica del género *Bacillus*. La abundancia relativa de esta colonia en el producto fue del 17,19%.

La colonia aislada se caracterizó por un color blanco pálido, forma y márgenes filamentosos, y sin elevación en altura. Los análisis bioquímicos realizados revelaron que era una bacteria Gram +, sin actividad catalasa ni oxidasa. Al inocular e incubar los sistemas de identificación miniaturizados API<sup>®</sup>, fue confirmada la asignación de la colonia como *Bacillus licheniformis* en las galerías API<sup>®</sup>50CHB/E (99,9% de seguridad en la identificación; APIWeb<sup>®</sup>).

#### 4.2.- VERIFICACIÓN DEL GRADO DE ENRIQUECIMIENTO DEL ALIMENTO VIVO (ROTÍFEROS) CON LAS NUEVAS FORMULACIONES DESARROLLADAS

En la Fig. 11 puede observarse el progreso del perfil lipídico de los rotíferos enriquecidos con la formulación ALLarvae 2.0 durante 16 horas, añadiendo una primera dosis de 0,2 g/L en t=0h y una segunda dosis de 0,1 g/L en t=13h.

Desde la adición de la primera dosis no se encontraron diferencias significativas en la composición lipídica de los rotíferos enriquecidos hasta t=8h. Así, desde t=0h hasta t=8h el porcentaje de lípidos en los rotíferos enriquecidos osciló entre un mínimo de  $18,74 \pm 2,58$  % (t=3h) y un máximo de  $27,88 \pm 12,06$  % (t=0h) (Fig. 11). En cambio, el porcentaje de lípidos en la composición de los rotíferos se redujo significativamente en t=13h, hasta un valor de  $16,24 \pm 4,87$  % (Fig. 11). Tras la aplicación de la dosis de refuerzo, el porcentaje de lípidos en los rotíferos enriquecidos fue significativamente superior en comparación con t=13h, pero no se hallaron diferencias significativas con el resto de puntos temporales. De este modo, el valor de lípidos en la composición de los rotíferos en t=16h fue de  $42,42 \pm 19,65$  % (Fig. 11).



**Figura 11:** Composición lipídica (%) de rotíferos enriquecidos con la formulación ALLarvae 2.0 durante un período de 16h, aplicándose una primera dosis antes de t=0h, y una segunda dosis de refuerzo después de t=13h. La línea horizontal señala los requisitos lipídicos teóricos de larvas de dorada (*Sparus aurata*). Las letras en minúscula denotan diferencias significativas (ANOVA unifactorial; análisis post hoc HSD Tukey;  $p < 0,05$ ).

### 4.3.- ENSAYO “IN VIVO” DEL PRODUCTO DE ENRIQUECIMIENTO DE ALIMENTO VIVO EN CULTIVO LARVARIO DE DORADA (*Sparus aurata*)

#### 4.3.1.- Análisis de parámetros de calidad del agua de los tanques de cultivo larvario

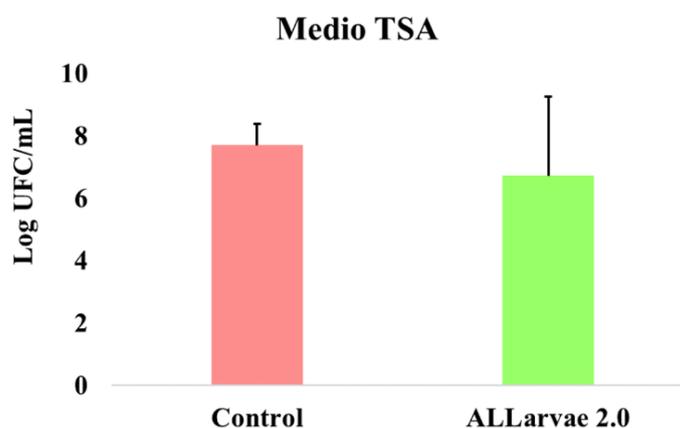
A lo largo de la duración del ensayo piloto de cultivo larvario de dorada, no se obtuvieron diferencias significativas entre los tres tratamientos en términos de temperatura, oxígeno disuelto, pH, nitratos y amonio (Tabla 8).

**Tabla 8:** Valores medios  $\pm$  desviación estándar de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), oxígeno disuelto en el agua (mg/L), pH, nitratos (mM) y amonio (mg/L) del agua de los tanques de cultivo larvario analizada durante el ensayo.

Parámetro	Control	ALLarvae 2.0	ALLarvae 2.0 POC
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	$18 \pm 0,59$	$18 \pm 0,59$	$18 \pm 0,59$
O <sub>2</sub> disuelto (mg/L)	$6,91 \pm 0,02$	$6,92 \pm 0,06$	$6,93 \pm 0,04$
pH	$7,80 \pm 0,25$	$7,73 \pm 0,35$	$7,79 \pm 0,26$
Nitratos (mM)	$0,022 \pm 0,100$	$0,011 \pm 0,062$	$0,014 \pm 0,072$
Amonio (mg/L)	$0,033 \pm 0,072$	$0,065 \pm 0,119$	$0,034 \pm 0,069$

#### 4.3.2.- Análisis de cuantificación bacteriana del agua de los tanques de enriquecimiento de alimento vivo, agua de los tanques de cultivo larvario y del tracto digestivo de larvas de dorada (*Sparus aurata*)

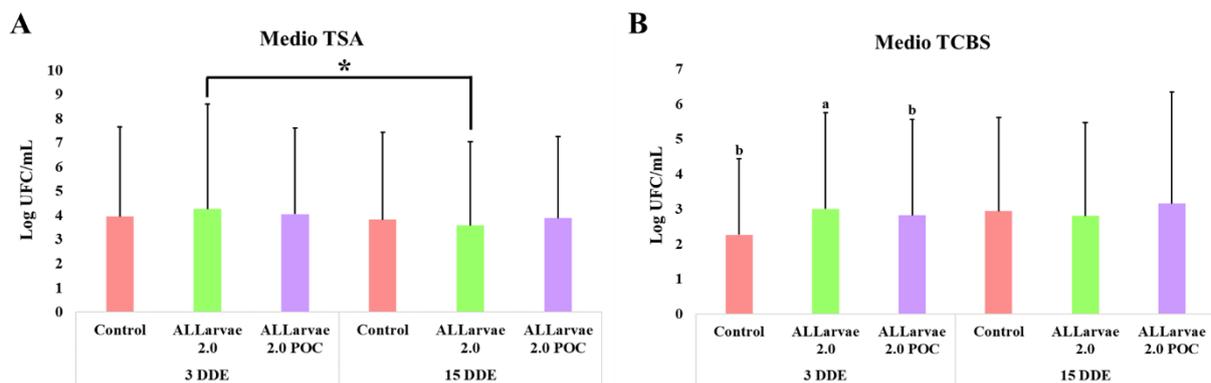
En relación con la cuantificación bacteriana del agua del tanque de enriquecimiento de rotíferos, no se hallaron diferencias significativas entre el producto control y la formulación ALLarvae 2.0 en medio de cultivo TSA (Fig. 12).



**Figura 12:** Cuantificación bacteriana en escala logarítmica (Log UFC/mL) del agua de enriquecimiento de rotíferos para los tratamientos control y ALLarvae 2.0 en el día 15 DDE (n=10 réplicas para cada tratamiento) (análisis de distribución t de Student;  $p < 0,05$ ).

Asimismo, no se obtuvieron diferencias significativas en el crecimiento bacteriano en medio TSA en el agua de los tanques de cultivo larvario entre los diferentes tratamientos a lo largo del ensayo (Fig. 13A). No obstante, sí hubo diferencias significativas en la cuantificación bacteriana de las muestras del agua entre el punto de muestreo inicial (3 DDE) y el segundo punto de muestreo (15 DDE) (Fig. 13A). En este sentido, se observaron valores en el agua en el día 3 DDE de  $12.651 \pm 2.757$  UFC/mL sin haber introducido alimento vivo en el tanque. En el punto de muestreo intermedio (15 DDE), estos valores se redujeron hasta una media de  $1.189 \pm 694$  UFC/mL.

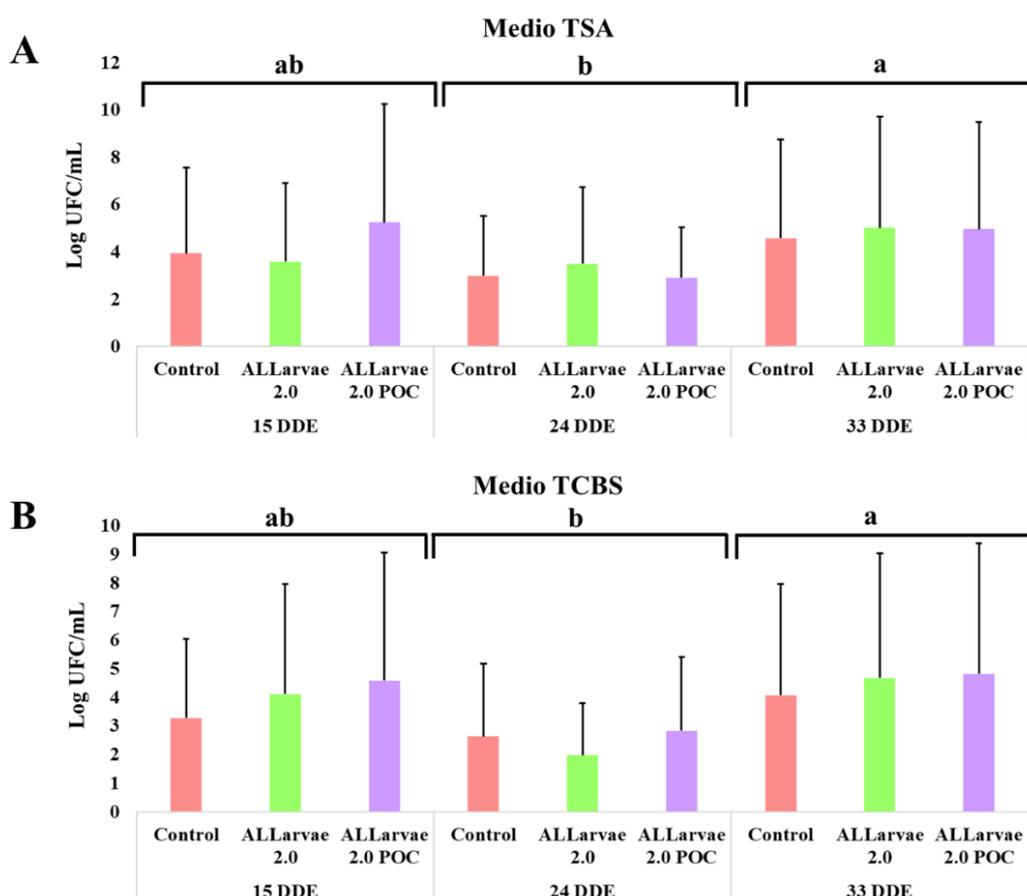
Por otro lado, se hallaron diferencias significativas en el crecimiento bacteriano en medio TCBS entre el tratamiento ALLarvae 2.0 ( $199 \pm 114$  UFC/mL) y los otros dos tratamientos restantes (Control:  $37 \pm 30$  UFC/mL; ALLarvae 2.0 POC:  $131 \pm 109$  UFC/mL) en el punto de muestreo inicial (3 DDE), sin haber añadido aún alimento vivo (Fig. 13B). Posteriormente, en el día 15 DDE, no se hallaron diferencias significativas en el crecimiento bacteriano en TCBS en el agua de los tanques de cultivo larvario entre los diferentes tratamientos (Fig. 13B). Asimismo, no existieron diferencias significativas en el crecimiento bacteriano en medio TCBS entre los días 3 DDE y 15 DDE.



**Figura 13:** Cuantificación bacteriana en escala logarítmica (Log UFC/mL) del agua de cultivo larvario en medio TSA (A) y medio TCBS (B) de los tres tratamientos en los días 3 DDE y 15 DDE (n=16 réplicas para cada tratamiento y cada medio de cultivo, en cada punto de muestreo). Las letras en minúscula denotan diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA unifactorial; análisis post hoc HSD Tukey;  $p < 0,05$ ). \* denota diferencias significativas entre los puntos de muestreo (análisis de distribución t de Student;  $p < 0,05$ ).

Con respecto al crecimiento bacteriano en el tracto digestivo de las larvas de dorada, no se hallaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos en medio TSA ni TCBS en ninguno de los 3 puntos de muestreo asignados (15 DDE, antes de la aplicación del antibiótico; 24 DDE, durante la aplicación del antibiótico; 33 DDE una semana después de la última aplicación del antibiótico) (Fig. 14A & 14B). Sin embargo, existieron diferencias significativas entre el punto de muestreo correspondiente a la aplicación del antibiótico y el correspondiente a la recuperación de la aplicación (Fig. 14A & 14B). Así, se observaron incrementos significativos en el crecimiento bacteriano del tracto gastrointestinal larvario desde el día 24 DDE hasta el día 33 DDE tanto en medio TSA como TCBS. Pese a no existir diferencias significativas en la cuantificación bacteriana del entre el día 15 DDE y 33

DDE, sí se apreció una tendencia a un crecimiento superior de la microbiota del tracto gastrointestinal en el caso del punto correspondiente a la recuperación de la aplicación del antibiótico (33 DDE) (Fig. 14A & 14B).



**Figura 14:** Cuantificación bacteriana en escala logarítmica (Log UFC/mL) del tracto digestivo de larvas de dorada (*Sparus aurata*) en medio TSA (A) y medio TCBS (B) de los tres tratamientos antes de la aplicación de antibióticos (15 DDE), durante la aplicación (24 DDE) y una vez finalizada la aplicación (33 DDE) (n=16 réplicas para cada tratamiento y cada medio de cultivo, en cada punto de muestreo). Las letras en minúscula denotan diferencias significativas entre los puntos de muestreo establecidos (ANOVA unifactorial; análisis post hoc HSD Tukey;  $p < 0,05$ ).

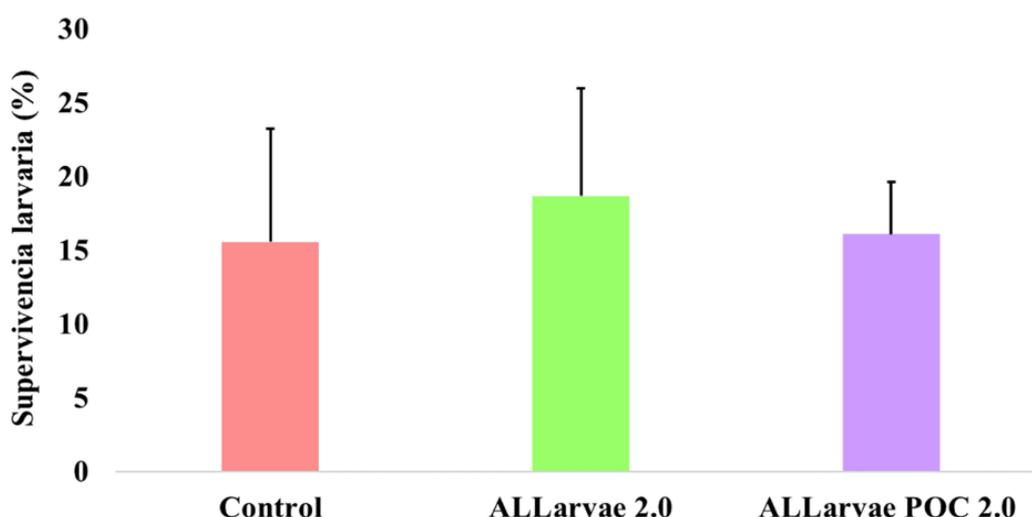
#### 4.3.3.- Análisis de identificación de estirpes bacterianas en el agua de los tanques de enriquecimiento de alimento vivo y en el tracto digestivo de larvas de dorada (*Sparus aurata*)

Fueron aisladas colonias similares (con aspecto de bacterias probióticas) a la identificada previamente en el producto ALLarvae 2.0, tanto en las muestras de agua de los tanques de enriquecimiento de alimento vivo con el tratamiento ALLarvae 2.0, como en el tracto gastrointestinal de las larvas de dorada correspondientes al mismo tratamiento. Nuevamente, ambas colonias mostraron indicios de ser bacterias pertenecientes al género *Bacillus*. Mientras que la abundancia relativa de la colonia aislada en el agua de los rotíferos enriquecidos fue de un 2,28%, en el tracto gastrointestinal de las larvas llegó hasta el 88,89% de abundancia relativa.

Ambas colonias se caracterizaron por un color blanco pálido, forma y márgenes filamentosos, y sin elevación en altura. Los análisis bioquímicos realizados revelaron que eran bacterias Gram +, sin actividad catalasa ni oxidasa. Al inocular e incubar los sistemas de identificación miniaturizados API<sup>®</sup>, fue confirmada la asignación de ambas colonias como *Bacillus licheniformis* en las galerías API<sup>®</sup>50CHB/E (99,9% de seguridad en la identificación; APIWeb<sup>®</sup>). De este modo, *Bacillus licheniformis* fue identificada tanto en la formulación ALLarvae 2.0, como en el agua de aplicación del producto para el enriquecimiento de alimento vivo, y por último, en el tracto gastrointestinal de las larvas de dorada enriquecidas con dicho tratamiento.

#### 4.3.4.- Supervivencia, crecimiento y desempeño biológico de las larvas de dorada (*Sparus aurata*)

Los valores de supervivencia larvaria registrados al final del ensayo (37 DDE) fueron de  $15,5 \pm 7,70$  % en el tratamiento control,  $18,7 \pm 7,31$  % en el tratamiento ALLarvae 2.0, y  $16,1 \pm 3,50$  % en el tratamiento ALLarvae 2.0 POC (Fig. 15). Pese a existir una tendencia de mayor grado de supervivencia con ambos tratamientos ALLarvae (Fig. 15), no se obtuvieron diferencias significativas en la supervivencia larvaria entre los tratamientos.

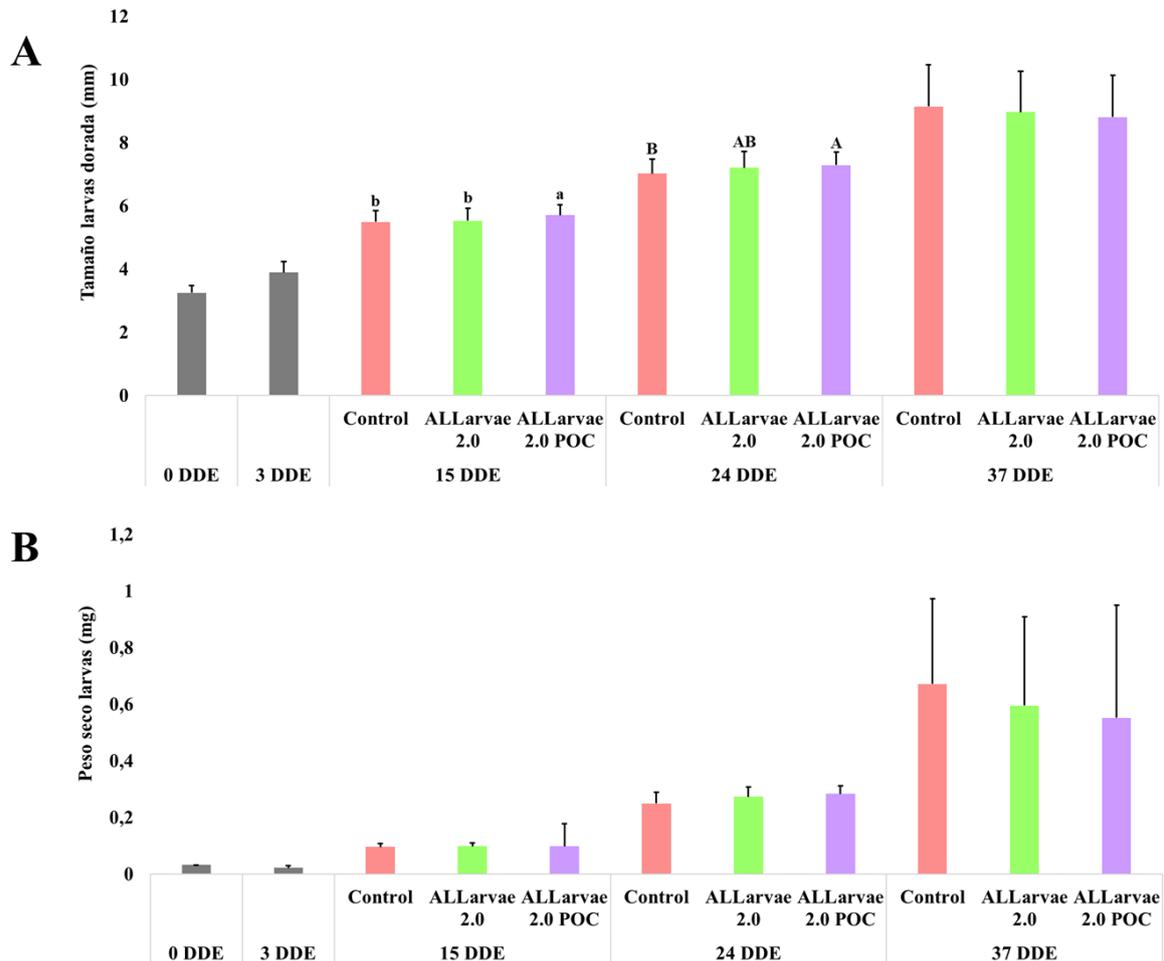


**Figura 15:** Porcentaje de supervivencia larvaria para cada uno de los tratamientos (control, ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC) al final del ensayo de cultivo de larvas de dorada (ANOVA unifactorial; análisis post hoc HSD Tukey;  $p < 0,05$ ).

En cuanto al desempeño biológico de las larvas de dorada, no se observaron diferencias significativas al final del ensayo (37 DDE) en relación con el tamaño de las larvas, su peso seco y el porcentaje de larvas con vejiga insuflada entre los tres tratamientos (Fig. 16A, Fig. 16B & Fig. 17).

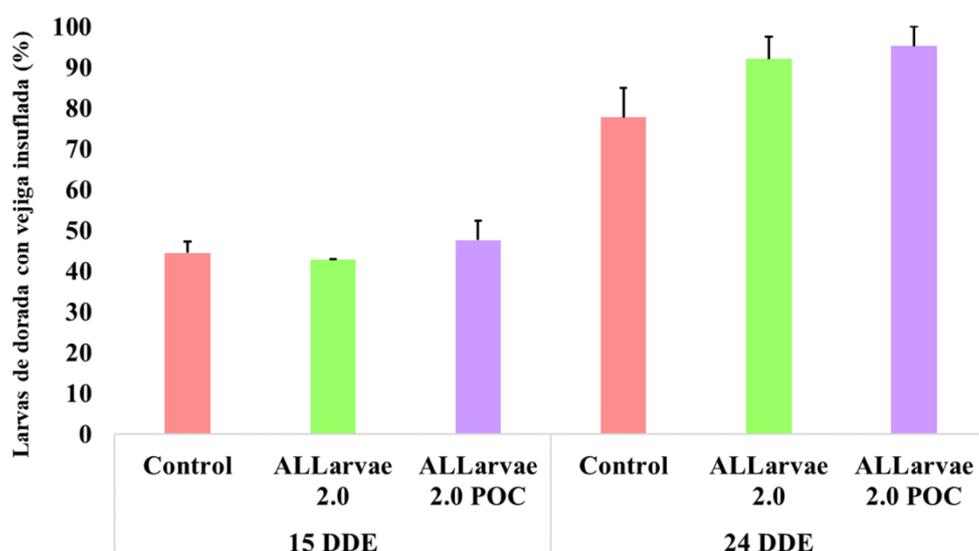
No obstante, sí existieron diferencias significativas en el tamaño de las larvas a lo largo del ensayo. Así, en el día 15 DDE las larvas correspondientes al tratamiento ALLarvae 2.0 POC fueron significativamente de mayor tamaño en comparación los otros dos tratamientos (Fig. 16A). Asimismo, en el día 24 DDE, las larvas correspondientes al tratamiento ALLarvae 2.0 POC fueron

significativamente mayores que aquellas correspondientes al tratamiento control (Fig. 16A). Al final del ensayo (37 DDE), el tamaño medio de las larvas de los tres tratamientos fue de  $8,97 \pm 0,17$  mm (Fig. 16A). Por otro lado, el peso seco medio de las larvas de los tres tratamientos en el día 37 DDE fue de  $0,61 \pm 0,34$  mg (Fig. 16B).



**Figura 16:** Valores medios de tamaño (mm) (A) y peso seco (mg) (B) de las larvas de dorada para cada uno de los tratamientos (control, ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC) en los días 0 DDE, 3 DDE, 15 DDE, 24 DDE y 37 DDE (n=180 réplicas en cada punto de muestreo, 60 para cada uno de los tratamientos) (ANOVA unifactorial; análisis post hoc HSD Tukey;  $p < 0,05$ ).

Adicionalmente, las larvas de dorada correspondientes a los tratamientos ALLarvae y ALLarvae 2.0 POC mostraron una tendencia de mayor porcentaje de insuflación de la vejiga en comparación con el tratamiento control, pese a no obtener diferencias significativas, especialmente en el día 24 DDE (Fig. 17).



**Figura 17:** Valores medios de porcentaje de larvas de dorada con vejiga insuflada para cada uno de los tratamientos (control, ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC) en los días 15 DDE y 24 DDE (n=180 réplicas en cada punto de muestreo, 60 para cada uno de los tratamientos, en cada uno de los puntos de muestreo) (ANOVA unifactorial; análisis post hoc HSD Tukey;  $p < 0,05$ ).

#### 4.4.- ENSAYO DE ESTRÉS POR TRANSPORTE DE LARVAS DE DORADA (*Sparus aurata*) CULTIVADAS CON PRODUCTOS PILOTO Y CONTROL DESPUÉS DEL DESTETE

##### 4.4.1.- Análisis de parámetros de calidad del agua de los sacos de transporte

No se observaron diferencias significativas en los diferentes parámetros de calidad del agua (temperatura, oxígeno disuelto, pH y amonio) de los sacos de transporte de las larvas de dorada entre el inicio y final del desplazamiento, así como a lo largo de su duración (Tabla 9).

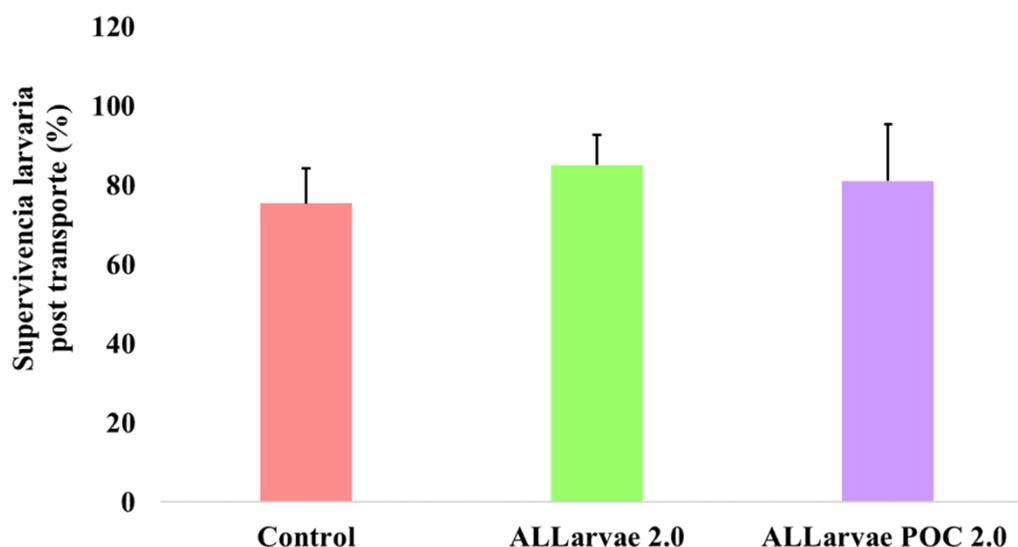
**Tabla 9:** Valores medios  $\pm$  desviación estándar de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), oxígeno disuelto en el agua (mg/L), pH y amonio (mg/L) del agua los sacos para el transporte de larvas de dorada durante el desplazamiento.

Parámetro	Antes	Después	Observaciones
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	18,3	20,6	Temperatura media durante transporte: $19,5 \pm 1,12$ $^{\circ}\text{C}$
O <sub>2</sub> disuelto (mg/L)	$6,4 \pm 0,18$ (antes de la inyección de O <sub>2</sub> )	$17,7 \pm 0,91$	
pH	$8,2 \pm 0,07$	$7,8 \pm 0,14$	Sin bajar de 7,46
Amonio (mg/L)	$0,126 \pm 0,045$	$0,592 \pm 0,012$	

##### 4.4.2.- Supervivencia al estrés por transporte de larvas de dorada (*Sparus aurata*)

Los valores de supervivencia larvaria registrados al final del transporte fueron de  $75,4 \pm 8,91$  % en el tratamiento control,  $85,1 \pm 7,55$  % en el tratamiento ALLarvae 2.0, y  $81 \pm 14,45$  % en el tratamiento

ALLarvae 2.0 POC (Fig. 18). Nuevamente, pese a existir una tendencia de mayor grado de supervivencia con ambos tratamientos ALLarvae (Fig. 18), no se obtuvieron diferencias significativas en la supervivencia larvaria entre los diferentes tratamientos.



**Figura 18:** Porcentaje de supervivencia larvaria para cada uno de los tratamientos (control, ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC) al final del ensayo de estrés por transporte con larvas de dorada (n=1.800 larvas de cada tratamiento) (ANOVA unifactorial; análisis post hoc HSD Tukey;  $p < 0,05$ ).

## 5.- DISCUSIÓN

Hasta el momento, la formulación de productos para nutrición en piscicultura basados principalmente en microalgas ha sido dificultosa debido a razones como el coste de producción de la biomasa, problemas relacionados con la digestibilidad de las microalgas o la reducción de la biodisponibilidad de compuestos intracelulares esenciales para un correcto desarrollo de los peces (p.e. vitaminas o aminoácidos libres) (Wells et al., 2017; Koyande et al., 2019; Sáez et al., 2022). No obstante, el empleo de microalgas como ingrediente funcional en formulaciones para nutrición de peces marinos o en dietas de enriquecimiento de alimento vivo es una valiosa alternativa frente al empleo de materias primas no sostenibles como el aceite y la harina de pescado (Vizcaíno et al., 2018). En este sentido, su administración puede suponer beneficios en diferentes parámetros fisiológicos de peces marinos como el correcto funcionamiento y estructuración de la mucosa intestinal, el estado oxidativo de los lípidos a nivel muscular así como en el grado de pigmentación (Vizcaíno et al., 2018; Basford et al., 2020; Sáez et al., 2022). Adicionalmente, la inclusión de algunas especies de microalgas en la dieta puede tener propiedades inmunoestimulantes, antioxidantes e incluso antipatogénicas (Vizcaíno et al., 2014; Sáez et al., 2022).

Así, el empleo estratégico de diferentes especies de microalgas junto con otros ingredientes como traustoquitridios y probióticos es teóricamente una solución óptima de cara a su inclusión en diferentes

productos nutricionales en acuicultura, y concretamente en piscicultura. Bajo esta perspectiva, en el presente Trabajo de Fin de Máster se analizó el desempeño y la viabilidad de un producto de enriquecimiento de alimento vivo basado mayoritariamente en microalgas y probióticos.

Uno de los puntos más críticos en la elaboración de una formulación de enriquecimiento de alimento vivo es su comportamiento en la columna de agua de los tanques donde se cultivan las presas vivas. En ocasiones, los productos destinados a la aplicación en tanques de cultivo en acuicultura se agregan provocando que formen una capa superficial, o bien que precipiten al fondo de los tanques (Conceição et al., 2010). En cualquiera de los dos casos, si un producto de enriquecimiento de alimento vivo precipita o se mantiene en la superficie deja de estar disponible para su ingesta por parte de rotíferos y artemias, y por ende, el grado de enriquecimiento disminuye (Conceição et al., 2010; Basford et al., 2020; Castanho et al., 2023). En general, los resultados obtenidos de ambas formulaciones ALLarvae en términos de suspensión, precipitación y aglomeración fueron óptimos para su aplicación en tanques de acuicultura (Fig. 6, 7 & 8).

Más en detalle, los resultados revelaron que el grado de suspensión fue significativamente menor (Fig. 6), y el grado de precipitación significativamente mayor (Fig. 7), en la formulación ALLarvae 2.0 POC frente a los dos productos alternativos. Asimismo, se observó una tendencia (pese a no existir diferencias significativas) a la presencia de aglomerados de microalgas de mayor tamaño en la formulación ALLarvae 2.0 POC frente a la versión ALLarvae sin *Porphyridium cruentum* (Fig. 8A). La posible razón atribuible a la obtención de estos resultados es la síntesis de exopolisacáridos por parte de *Porphyridium cruentum*, el único ingrediente adicional que explicaría las diferencias con respecto a la formulación ALLarvae 2.0 (Tabla 4). En este sentido, los exopolisacáridos pueden aglutinar las partículas de los diferentes ingredientes del producto, provocando una mayor decantación en la columna de agua (Zhao et al., 2020; Casas-Arrojo et al., 2021; Risjani et al., 2021; Liberti et al., 2023). Si bien no se hallaron diferencias significativas en la suspensión entre el producto control y la formulación ALLarvae 2.0, sí se obtuvieron en términos de precipitación (Fig. 7). En este sentido, son resultados que cabría esperar con antecedencia, debido a que la tipología en polvo de la formulación piloto ALLarvae 2.0 promueve una mayor precipitación frente a la tipología líquida del producto comercial control. Pese a ello, no se encontraron problemas relacionados con la suspensión, precipitación o aglomeración de las nuevas formulaciones desarrolladas en su aplicación en tanques de enriquecimiento de alimento vivo.

Los niveles elevados de nitratos o de amonio en el agua pueden afectar a la fisiología del alimento vivo debido a su toxicidad, especialmente en sistemas intensivos con altas densidades de cultivo. De hecho, los rotíferos son habitualmente considerados bioindicadores de ambos parámetros en el medio natural ante la presencia de contaminación (Bielanska-Grajner & Gladysz, 2010; Ji et al., 2013). Los resultados obtenidos en relación con los parámetros químicos de los productos mostraron una presencia significativamente menor de nitratos en ambas formulaciones ALLarvae frente al producto comercial

control (Fig. 9). Asimismo, no se detectó la presencia de amonio en los tres productos analizados. Estos resultados se pueden explicar por la presencia de probióticos (especies del género *Bacillus*) en las formulaciones ALLarvae, que pueden influir directamente en el decrecimiento de los niveles de nitratos y amonio, debido a que son capaces de asimilar ambos compuestos como fuente de nitrógeno (Camargo et al., 2005). Consecuentemente, la utilización de las formulaciones ALLarvae en sistemas intensivos de cultivo de alimento vivo puede reducir el riesgo del colapso ante el crecimiento de estos parámetros químicos frente al producto control.

En relación con la cuantificación bacteriana de los diferentes productos analizados, el crecimiento obtenido en medios de cultivo no selectivos (TSA y PCA) fue significativamente mayor en la formulación ALLarvae 2.0 frente al producto comercial control (Fig. 10A & 10B). Los datos obtenidos se corresponden con los resultados esperados, ya que la formulación ALLarvae 2.0 presenta probióticos bacterianos en su composición al contrario que la emulsión lipídica comercial. En consecuencia, la metodología de aplicación de las formulaciones ALLarvae fue optimizada para evitar el crecimiento bacteriano excesivo a través de la reducción del tiempo de enriquecimiento (Tabla 6). Por otra parte, el número de colonias observadas fue más reducido en el medio TCBS, especializado para el aislamiento de bacterias de la familia Vibrionaceae (Tagliavia et al., 2019; Sanches-Fernandes et al., 2022), pese a que no se hallaron diferencias significativas entre la formulación ALLarvae 2.0 y el producto control (Fig. 10C).

**Tabla 10:** Comparativa de los valores relacionados con lípidos más importantes en el desarrollo de larvas de dorada (*Sparus aurata*) (Bessonart et al., 1999; Izquierdo, 2005; Hamre et al., 2013; Arantzamendi et al., 2019) frente a los parámetros del producto control comercial analizado y ambas formulaciones piloto ALLarvae 2.0 y 2.0 POC.

Composición lipídica	Requisitos teóricos dorada	Control	ALLarvae 2.0	ALLarvae 2.0 POC
DHA/EPA	2 (>1,2)	11	2,26	2,41
EPA/ARA	4 (>2)	3,32	3,54	3,07
DHA (%)	1,8 – 2 (>0,8)	17,18	4,66	4,97
EPA (%)	1 (>0,7)	1,56	2,06	2,06
ARA (%)	1 (>0,5)	0,47	0,58	0,67

Por otro lado, los parámetros de composición bioquímica en términos de macronutrientes y micronutrientes tienen especial importancia en el desarrollo de un producto de enriquecimiento de alimento vivo. Esto se debe a que, en gran medida, son el principal factor que define la adecuación de una formulación para su aplicación “*in vivo*”. Los valores de composición proximal lipídicos y proteicos correspondientes a las dos formulaciones ALLarvae definitivas (ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC) se hallaron próximos o por encima los requisitos teóricos correspondientes a las larvas de dorada (Tablas

1 & 7). Si bien los valores de proteínas en las formulaciones ALLarvae son más reducidos frente a los requisitos teóricos larvarios (Tablas 1 & 7), en el caso del producto control es aún más notorio, de modo que su contenido proteico (19,3%) se reduce más de la mitad frente a los requisitos teóricos de larvas de *Sparus aurata* (43-46%) (Tablas 1 & 7). En cambio, el contenido lipídico por parte del producto control (38%) prácticamente duplica el valor de los requisitos teóricos para larvas de dorada (18-22%) (Tablas 1 & 7). De la misma forma, las proporciones de ácidos grasos esenciales, especialmente en el caso del porcentaje de DHA y consecuentemente el ratio DHA/EPA, se encuentran muy por encima de los valores óptimos teóricos (Tabla 10).

Además del producto control analizado en este trabajo, el aumento en la composición proximal en lo referente al contenido lipídico es habitual en otros productos comerciales de enriquecimiento (Fernández-Reiriz et al., 1993; Hamre, 2016; Basford et al., 2020). Esto es debido a los procesos de digestión por parte de rotíferos y artemias, modificando su perfil lipídico a lo largo del tiempo (Basford et al., 2020; Paulo et al., 2020). En este sentido, las artemias se caracterizan por una rápida conversión de DHA a EPA, de ahí la necesidad de aumentar las proporciones de dicho parámetro para un enriquecimiento óptimo (Basford et al., 2020; Paulo et al., 2020). Sin embargo, la ganancia en lípidos esenciales se realiza con base en un consecuente déficit proteico, de modo que dichas deficiencias pueden afectar a los niveles de crecimiento y supervivencia larvarios (Hamre et al., 2013). Además, un exceso en la inclusión de lípidos en dietas comerciales puede derivar también en efectos perjudiciales como la reducción del crecimiento o un impacto negativo en la utilización de los nutrientes (Vizcaíno et al., 2018; Basford et al., 2020). Consecuentemente, las formulaciones ALLarvae fueron desarrolladas con mayor atención a todos los elementos con influencia directa en el desarrollo larvario de peces marinos, con el objetivo de minimizar las deficiencias nutricionales y posibles consecuencias en mortalidad o deformaciones que conlleva el empleo de productos menos especializados.

En términos nutricionales, es ampliamente conocido que múltiples especies de microalgas pueden ser una fuente valiosa de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs n-3) (Vizcaíno et al., 2014; Vizcaíno et al., 2018; Basford et al., 2020; Pulido-Rodríguez et al., 2021; Sáez et al., 2022). Algunos parámetros tienen mayor relevancia para un correcto desarrollo larvario en peces marinos como es el caso de los niveles de DHA, de EPA y de ARA así como las proporciones DHA/EPA y EPA/ARA (Basford et al., 2020; Paulo et al., 2020). En la formulación de los enriquecimientos ALLarvae se optó por introducir adicionalmente *Aurantiochytrium* sp. (Tabla 4), debido a los altos niveles de DHA en su composición, con el objetivo de situarse en un rango óptimo en términos nutricionales. Tal y como se observa en la Tabla 10, las formulaciones ALLarvae se ajustan en mayor medida a los valores óptimos establecidos para la alimentación de larvas de dorada en relación con los parámetros previamente mencionados (Bessonart et al., 1999; Izquierdo, 2005; Hamre et al., 2013; Arantzamendi et al., 2019).

Concretamente, los niveles de DHA han sido especialmente considerados importantes para un crecimiento y desarrollo adecuado en larvas de peces marinos (Hamre et al., 2013; Paulo et al., 2020). Sin embargo, en estudios previos de cultivo de larvas de peces marinos alimentadas con presas vivas enriquecidas con microalgas, y menor contenido en DHA frente a una emulsión comercial, presentaron igualmente mayor supervivencia y crecimiento (Basford et al., 2020). De este modo, cabe pensar que hay otros factores más allá de los porcentajes de inclusión que pueden influir en el éxito nutricional de una formulación. En este sentido, se ha comprobado previamente que formulaciones con niveles lipídicos reducidos y con microalgas en su composición presentaban un mayor grado de asimilación selectiva de PUFAs n-3, y especialmente de DHA, por parte de los tejidos musculares de peces marinos como *Sparus aurata*, frente a otras formulaciones con mayores proporciones de lípidos en su composición (Sáez et al., 2022). Así, se puede inferir que pese a que las formulaciones ALLarvae presenten un porcentaje de lípidos menor en su composición respecto al producto control, las propiedades inherentes de la inclusión de microalgas en la formulación fomentan una mayor asimilación de los ácidos grasos esenciales para el desarrollo larvario.

Además del propio perfil nutricional de los productos para enriquecimiento, cabe destacar que es igualmente relevante la naturaleza de los ingredientes incluidos en las formulaciones. En este sentido, algunos lípidos esenciales, como es el caso del EPA, son más susceptibles a daños estructurales cuando son extraídos de la fuente de origen, por ejemplo mediante métodos enzimáticos (Sáez et al., 2022). En consecuencia, la administración de células no modificadas (microalgas liofilizadas sin hidrólisis) deriva en un proceso “microencapsulación natural”, que favorece el mantenimiento del perfil nutricional teórico de los ingredientes del producto, y por tanto asegura un mejor desempeño de cara al enriquecimiento de presas vivas. Un caso relativamente similar es la necesidad de añadir un suplemento vitamínico especializado en las formulaciones ALLarvae de modo que, pese a que las microalgas pueden tener contenidos vitamínicos interesantes, éstas no se encuentran biodisponibles en su totalidad para su asimilación si las células se administran integralmente sin un proceso de extracción previo (Wells et al., 2017; Koyande et al., 2019).

En cuanto al ensayo de verificación del grado de enriquecimiento de rotíferos, sólo se hallaron diferencias significativas en la composición lipídica de éstos en los puntos temporales  $t=13h$  (antes de administrar la segunda dosis) y  $t=16h$  (fin del enriquecimiento en el protocolo inicial) (Fig. 11). Desde el inicio del ensayo, el porcentaje de lípidos en los rotíferos se situó en torno al 18-22%, próximo al requisito óptimo teórico para alimentar larvas de dorada (Fig. 11). Por tanto, la duración del protocolo final para la aplicación del producto se situó finalmente en 6 horas, sin la necesidad de una segunda dosis para el enriquecimiento de rotíferos con base en los resultados obtenidos. El protocolo designado finalmente facilita en gran medida la aplicación del producto en términos logísticos, especialmente en el caso del enriquecimiento de rotíferos, y tiene una duración y cantidades de aplicación similares al producto control y a otros productos comerciales (Fernández-Reiriz et al., 1993; Hamre, 2016).

Asimismo, mediante la aplicación de este protocolo, el perfil nutricional de los rotíferos enriquecidos en términos lipídicos fue superior en comparación con otras formulaciones comerciales (Fernández-Reiriz et al., 1993; Hamre, 2016). Por tanto, cabe destacar que el enriquecimiento del alimento vivo se realiza de manera satisfactoria con el protocolo diseñado para ello (Tabla 6), manteniendo las presas vivas un perfil lipídico óptimo para la alimentación de larvas de dorada (Fig. 11) (Tabla 1).

Una vez los productos fueron aplicados en tanques de enriquecimiento de presas vivas, no se observaron diferencias significativas en la cuantificación bacteriana en medio TSA entre los tanques tratados con la formulación ALLarvae y aquellos en los que se aplicó el producto control comercial, existiendo cierta tendencia a un mayor crecimiento bacteriano en los tanques asignados al producto control (Fig. 12). Estos resultados contrastan con los obtenidos en relación con la cuantificación bacteriana de los propios productos, donde el crecimiento bacteriano era significativamente mayor en la formulación ALLarvae (Fig. 10A). Anteriormente, se ha constatado que la aplicación de emulsiones lipídicas en tanques de presas vivas promueve la regurgitación del producto debido a su tipología, afectando consecuentemente a la calidad del agua de cultivo (Basford et al., 2020). Así, se puede determinar que una vez los productos son aplicados, el producto control provoca un mayor crecimiento bacteriano en el agua de los tanques frente a la formulación ALLarvae, debido a las características menos propicias de las emulsiones lipídicas para su utilización en acuicultura.

Por otro lado, no se comprobó una influencia diferencial de los tratamientos a lo largo del ensayo en el crecimiento bacteriano en medios TSA y TCBS en el agua de cultivo larvario ni en la microbiota del tracto gastrointestinal de las larvas de dorada, al no existir diferencias significativas en ninguno de los casos (Fig. 13 & 14). Las diferencias significativas halladas en la cuantificación bacteriana en el tracto gastrointestinal larvario entre los puntos de muestreo 24DDE y 33DDE se debió al tratamiento con antibióticos durante el ensayo (Fig. 14). En este sentido, es normal un crecimiento bacteriano significativo en el día 33DDE, 7 días después de la finalización del tratamiento con antibióticos (Carlson et al., 2017; Rosado et al., 2019; Payne et al., 2022). No obstante, se observó una tendencia a un mayor crecimiento bacteriano en el tracto gastrointestinal de las larvas correspondientes a ambos tratamientos ALLarvae durante la totalidad del ensayo (Fig. 14). Una de las posibles razones para la obtención de estos datos sería el efecto del probiótico incluido en ambas formulaciones ALLarvae por lo que un mayor grado de cuantificación bacteriana no tendría por qué tener connotaciones negativas.

En relación con la inclusión funcional de probióticos en las formulaciones ALLarvae 2.0, los resultados obtenidos mostraron que la especie de bacteria probiótica *Bacillus licheniformis* fue identificada en el producto inicial, en el agua de cultivo de rotíferos y en el tracto gastrointestinal de las larvas de *Sparus aurata*. En estudios previos se ha determinado que esta especie probiótica tiene efectos como una actividad antagonista frente a potenciales patógenos, actividad antimicrobiana frente a “*biofilms*” bacterianos y la mejora del estado de la microbiota intestinal (Romanova et al., 2020; Hamza et al.,

2016; Hoseinifar et al., 2018; Soltani et al., 2019). *Bacillus licheniformis* es una bacteria especialmente propicia para la administración en peces marinos a través de su inclusión en la dieta, debido a la formación de esporas que son capaces de resistir los ácidos gástricos hasta su llegada al intestino de los peces (Romanova et al., 2020). De este modo, se puede constatar la obtención del objetivo que tiene la adición de probióticos en un producto de enriquecimiento, asegurando una transferencia hasta las larvas de dorada cultivadas, con los consiguientes efectos positivos en la salud de éstas y la mejora de su resistencia frente al estrés patogénico (Cerezuela et al., 2012). Sin embargo, las propiedades antimicrobianas de la especie *Porphyridium cruentum* suscitan dudas acerca del posible efecto contrario no intencional que se puede obtener al inhibir la acción de las bacterias probióticas (Zhao et al., 2020; Casas-Arrojo et al., 2021; Risjani et al., 2021; Liberti et al., 2023), provocando que la sinergia entre ambos ingredientes sea imprevisible.

Por último, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia larvaria al finalizar los ensayos de cultivo larvario de dorada y de estrés por transporte. No obstante, se observó de nuevo una tendencia a una mayor supervivencia en las larvas correspondientes a los tratamientos ALLarvae frente al producto control en ambos ensayos (Fig. 15 & 18). En el caso de la formulación ALLarvae 2.0 tienen especial relevancia los datos obtenidos en supervivencia, ya que el ensayo comenzó sin haber adicionado alimento alguno con una cuantificación significativamente mayor de crecimiento bacteriano en medio TCBS frente a los otros dos tratamientos (Fig. 13B), con el consiguiente estrés por la presencia de posibles patógenos en el agua de cultivo que esto supone. Por otro lado, al final del ensayo de cultivo de larvas de dorada tampoco se observaron diferencias significativas en el crecimiento larvario o en la proporción de ejemplares con vejiga insuflada (Fig. 16 & 17). Pese a ello, las larvas correspondientes al tratamiento con ALLarvae 2.0 POC mostraron un crecimiento significativamente mayor en las primeras fases del ensayo (Fig. 16A). Este hecho se debe probablemente al efecto promotor del crecimiento en larvas que supone la inclusión de *Porphyridium cruentum* en la formulación, del cual se tiene constancia en estudios previos (Zhao et al., 2020). Además, la tendencia en la proporción de ejemplares con vejiga insuflada durante el ensayo fue mayor en ambos tratamientos ALLarvae frente al producto control (Fig. 17), lo cual tiene un efecto directo en la supervivencia final obtenida. Una posible razón atribuible a estos resultados es la presencia de mayor cantidad de grasas en el caso del tratamiento control debido al mayor contenido lipídico del producto, lo cual podría generar la formación de una fina capa lipídica en la superficie del tanque que dificulte en mayor medida la insuflación de la vejiga por parte de las larvas de dorada.

En definitiva, las formulaciones piloto ALLarvae de enriquecimiento de alimento vivo mostraron resultados similares en relación con el crecimiento y la supervivencia de larvas de dorada frente a un producto comercial. El seguimiento de los parámetros de calidad del agua durante los ensayos permitió descartar su influencia en las diferencias obtenidas entre los diferentes tratamientos. Pese a que no se obtuvieron diferencias significativas en el desempeño biológico entre las formulaciones desarrolladas y

el producto control comercial tras la realización de ambos ensayos, en base a los análisis realizados, la valoración del producto de enriquecimiento de alimento vivo desarrollado para el cultivo de larvas de peces marinos es positiva. Dicha ausencia de diferencias significativas entre formulaciones desarrolladas y un producto comercial de éxito en términos de supervivencia y crecimiento revela que el producto desarrollado se ha elaborado de acuerdo con las necesidades nutricionales de larvas de peces marinos, y en especial de la dorada. En el caso concreto del tratamiento ALLarvae 2.0, pese que inicialmente fueron los tanques con mayor estrés por la presencia de potenciales patógenos, fue aquel en el que se obtuvo mayor supervivencia tanto en el cultivo larvario como en el estrés por transporte.

Así, en términos generales se observa una tendencia a mejores resultados con las formulaciones ALLarvae ante condiciones adversas, como en este caso fueron los picos de mortalidad a causa del incremento bacteriano en los tanques. Este hecho se relaciona con la inclusión funcional de ingredientes con efectos positivos en el desarrollo larvario como las microalgas y suplementos probióticos. De cara a ampliaciones futuras, podría considerarse la realización de modificaciones de la formulación para adaptarse al enriquecimiento de presas vivas para el cultivo de larvas de peces planos marinos, ya que presentan mayores diferencias en términos de requisitos nutricionales respecto a la dorada y otras especies relacionadas.

## **6.- CONCLUSIONES**

I.- Los resultados obtenidos a partir de los análisis laboratoriales de las formulaciones ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC mostraron que el comportamiento de ambas es adecuado en términos de suspensión en la columna de agua, precipitación y presencia de aglomerados. Concretamente, la formulación ALLarvae 2.0 mostró mejores resultados y el protocolo de aplicación fue optimizado para mitigar los posibles problemas de precipitación ocasionados por la tipología en polvo del producto. Asimismo, esta tipología también conlleva ventajas en términos logísticos para su aplicación en acuicultura.

II.- Las formulaciones ALLarvae presentan un mayor crecimiento bacteriano en medios de cultivo no específicos (TSA y PCA) *per se*, debido a la presencia de probióticos en su composición en comparación con un producto comercial. Sin embargo, no existen diferencias significativas en el crecimiento bacteriano en un medio de cultivo designado para el crecimiento de bacterias de la familia Vibrionaceae (TCBS). Además, las características de las formulaciones ALLarvae favorecen la reducción del crecimiento bacteriano en tanques de enriquecimiento de rotíferos tras su aplicación respecto a un producto comercial.

III.- En términos nutricionales, las formulaciones ALLarvae se caracterizan por una composición proximal específicamente diseñada para el adecuado desarrollo de larvas de peces marinos, con especial atención a la dorada (*Sparus aurata*) y otras especies cultivadas con requerimientos nutricionales similares. Así, los contenidos de lípidos y proteínas se asemejan en mayor medida a los requisitos

teóricos de las larvas de peces marinos, en contraste con el desajuste actual existente entre dichos requerimientos y la composición de los productos de enriquecimiento comercializados.

IV.- El alimento vivo fue enriquecido satisfactoriamente con las formulaciones ALLarvae aplicando el protocolo diseñado. En este sentido, las formulaciones desarrolladas propiciaron la consecución de un perfil lipídico óptimo en presas vivas, que cumple con los requisitos teóricos de las larvas de peces marinos, siendo éste uno de los factores de mayor relevancia para la alimentación larvaria.

V.- El desempeño biológico de las larvas de dorada cultivadas en el ensayo correspondientes a los tratamientos ALLarvae fue similar al de un producto comercial de éxito, de modo que no se hallaron diferencias significativas en crecimiento y peso seco tras el destete. Asimismo, la inclusión de *Porphyridium cruentum* en una formulación supuso un mayor crecimiento significativo de las larvas respecto al resto de tratamientos durante las primeras fases del cultivo larvario, como consecuencia de la actividad promotora del crecimiento de esta microalga.

VI.- La inclusión de probióticos en las formulaciones ALLarvae resultó exitosa, de forma que se demostró la transferencia de especies probióticas hasta el agua de cultivo del alimento vivo y finalmente hasta el tracto gastrointestinal de las larvas de dorada, con los consiguientes efectos beneficiosos que supone su presencia. No obstante, la actividad antimicrobiana de *Porphyridium cruentum* suscita dudas acerca de una posible interferencia en la efectividad de los probióticos en el caso de la formulación ALLarvae 2.0 POC.

VII.- La supervivencia de las larvas de dorada correspondientes a ambas formulaciones ALLarvae fue superior respecto a un producto comercial de éxito, pese a no obtener diferencias significativas. Los mejores resultados de supervivencia correspondieron al tratamiento ALLarvae 2.0 en comparación con los dos tratamientos alternativos.

VIII.- Tras la simulación de estrés por transporte (desplazamiento de larvas de dorada desde una “hatchery” hasta una “nursery”), la supervivencia fue superior en el caso de ambas formulaciones ALLarvae frente al producto comercial control pese a no obtener diferencias significativas. Nuevamente, el producto con mejores resultados en este aspecto fue la formulación ALLarvae 2.0 respecto a los otros dos tratamientos.

IX.- En definitiva, se ha desarrollado exitosamente un producto comercial de enriquecimiento de alimento vivo mayoritariamente basado en microalgas y probióticos, sin la inclusión de materias primas no sostenibles como aceite y harina de pescado. Debido a sus características, la utilización funcional de estos ingredientes promueve diferentes beneficios biológicos respecto a los productos comerciales existentes, especialmente ante eventos de estrés patológico o de cualquier otro tipo.

## 7.- AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a la compañía Necton S.A. por su acogida y la oportunidad brindada para la realización de este Trabajo de Fin de Máster. En este sentido quiero agradecer especialmente a Patrícia Diogo, Victoria del Pino, Gonçalo Bastos e Inês Costa; del mismo modo que al resto del personal de los departamentos de I+D y producción de la empresa.

Por otro lado, agradezco a la Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO, IPMA) por la cesión de las instalaciones para la realización de los ensayos “*in vivo*” y la participación de su personal en el proyecto. Más en detalle, agradezco el apoyo profesional de todas las personas involucradas en la realización de tareas correspondientes a los ensayos: Sara Castanho, Pedro Pousão-Ferreira, Florbela Soares, Cátia Lourenço-Marques, Ana Candeia-Mendes, Carolina Ribeiro, Marcelo Livramento, Íñigo Ochoa, Mafalda Rocha, Ângelo Viegas e Inês Freitas.

Del mismo modo, agradezco al grupo de investigación MarBiotech (CCMAR; Universidade do Algarve) dirigido por João Varela, y en especial a Filipa Pinheiro por la realización de análisis bioquímicos esenciales para la elaboración de este trabajo. Asimismo, agradezco a la empresa Aqualvor (Piscicultura do Vale da Lama), en especial a João Cruz y António Vieira, por su colaboración en el desarrollo del producto ALLarvae.

Por último, agradezco a las entidades financiadoras del proyecto ALLarvae: CRESC Algarve 2020 (Portugal 2020) y el Fondo Europeo para el Desarrollo Regional de la Unión Europea (FEDER).

## 8.- BIBLIOGRAFÍA

APROMAR (2022). *La acuicultura en España en 2022*. Asociación Empresarial de Acuicultura en España. Cádiz, España.

Aragão, C., Cabano, M., Colen, R., Fuentes, J. & Dias, J. (2019). Alternative formulations for gilthead seabream diets: Towards a more sustainable production. *Aquaculture Nutrition* 26: 444-455. DOI: 10.1111/anu.13007

Arantzamendi, L., Roo, F., Hernández-Cruz, C. M., Fernández-Palacios, H. & Izquierdo, M. (2019). Lipid digestion capacity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) from first feeding to commercial size. *Fish Physiology and Biochemistry* 45: 469-484. DOI: 10.1007/s10695-018-0577-y

Arechavala-López, P., Toledo-Guedes, K., Izquierdo-Gómez, D., Segvic-Bubic, T. & Sánchez-Jerez, P. (2018). Implications of Sea Bream and Sea Bass Escapes for Sustainable Aquaculture Management: A Review of Interactions, Risks and Consequences. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 26 (2): 214-234. DOI: 10.1080/23308249.2017.1384789

Bandarra, N., Rema, P., Batista, I., Pousão-Ferreira, P., Valente, L., Batista, S. & Ozório, R. (2011). Effects of dietary n-3/n-6 ratio on lipid metabolism of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *European Journal of Lipid Science and Technology* 113 (11): 1332-1341. DOI: 10.1002/ejlt.201100087

Basford, A. J., Mos, B., Francis, D. S., Turchini, G. M., White, C. A. & Dworjanyn, S. (2020). A microalga is better than a commercial lipid emulsion at enhancing live feeds for an ornamental marine fish larva. *Aquaculture* 523: 735203. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735203

- Bessonart, M., Izquierdo, M. S., Salhi, M., Hernández-Cruz, C. M., González, M. M. & Fernández-Palacios, H. (1999). Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture* 179: 265-275. DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00164-7
- Bielanska-Grajner, I. & Gladysz, A. (2010). Planktonic rotifers in mining lakes in the Silesian Upland: Relationship to environmental parameters. *Limnologia* 40: 67-72. DOI: 10.1016/j.limno.2009.05.003
- Cahu, C., Zambonino-Infante, J. & Takeuchi, T. (2003). Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227: 245-258. DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00507-6
- Camargo, J. A., Alonso, A. & Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58: 1255-1267. DOI: :10.1016/j.chemosphere.2004.10.044
- Carlson, J., Leonard, A. B., Hyde, E. R., Petrosino, J. F. & Primm, T. P. (2017). Microbiome disruption and recovery in the fish *Gambusia affinis* following exposure to broad-spectrum antibiotic. *Infection and Drug Resistance* 10: 143-154. DOI: 10.2147/IDR.S129055
- Casas-Arrojo, V., Decara, J., Arrojo Agudo, M. A., Pérez-Manríquez, C. & Abdala-Díaz, R. T. (2021). Immunomodulatory, Antioxidant Activity and Cytotoxic Effect of Sulfated Polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. (S.F.Gray) Nägeli. *Biomolecules* 11: 488. DOI: 10.3390/biom11040488
- Cashion, T., Le Manach, F., Zeller, D. & Pauly, D. (2017). Most destined fish for fishmeal production are food-grade fish. *Fish and Fisheries* 18 (5): 837-844. DOI: 10.1111/faf.12209
- Castanho, S. I. C., Ribeiro, L., Gamboa, A. M., Candeias-Mendes, A., Rocha, M., Freitas, I., Viegas, A., Viegas, M., Barata, M., Soares, F. & Pousão-Ferreira, P. (2023). *Feeding different marine fish larvae species in aquaculture*. Actas del Congreso 46th Larval Fish Conference, Lisboa, 8-11 de mayo de 2023.
- Cerezuela, R., Guardiola, F. A., González, P., Meseguer, J. & Esteban, M. A. (2012). Effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Tetraselmis chuii*, and *Phaeodactylum tricornutum*, singularly or in combination, on the immune response and disease resistance of sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 33 (2): 342-349. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.05.004
- Conceição, L. E. C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S. & Dinis, M. T. (2010). Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research* 41: 613-640. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x
- Dawood, M. A. O., Koshio, S., Abdel-Daim, M. & Van Doan, H. (2019). Probiotic application for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 11: 907-924. DOI: 10.1111/raq.12272
- del Valle, J. C., Bonadero, M. C. & Fernández-Giménez, A. V. (2023). *Saccharomyces cerevisiae* as probiotic, prebiotic, synbiotic, postbiotics and parabiotics in aquaculture: an overview. *Aquaculture* 569: 739342. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2023.739342
- Díaz-Rosales, P., Chabrilón, M., Abdala, R. T., Figueroa, F. L., Balebona, M. C. & Moriñigo, M. A. (2008). Effect of dietary administration of *Porphyridium cruentum* on the respiratory burst activity of sole, *Solea senegalensis* (Kaup), phagocytes. *Journal of Fish Diseases* 31: 489-495. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2008.00923.x
- Domínguez, D., Rimoldi, S., Robaina, L., Torrecillas, S., Terova, G., Zamorano, M., Karalazos, V., Hamre, K. & Izquierdo, M. (2017). Inorganic, organic, and encapsulated minerals in vegetable meal based diets for *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758). *PeerJ* 5: e3710. DOI: 10.7717/peerj.3710
- Domínguez, D., Robaina, L., Zamorano, M. J., Karalazos, V. & Izquierdo, M. (2019). Effects of zinc and manganese sources on gilthead seabream (*Sparus aurata*) fingerlings. *Aquaculture* 505: 386-392. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.03.004
- Domínguez, D., Sehnine, Z., Castro, P., Robaina, L., Fontanillas, R., Prabhu, P. & Izquierdo, M. (2020). Optimum selenium levels in diets high in plant-based feedstuffs for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings. *Aquaculture Nutrition* 26 (2): 579-589. DOI: 10.1111/anu.13019

- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S. & Olivia-Teles, A. (2011). Dietary Carbohydrate Utilization by European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) Juveniles. *Reviews in Fisheries Science* 19 (3): 201-215. DOI: 10.1080/10641262.2011.579363
- Estévez, A., McEvoy, L. A., Bell, J. G. & Sargent, J. R. (1999). Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in Arachidonic and Eicosapentaenoic acids. *Aquaculture* 180: 321-343. DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00209-4
- Estévez, A. & Giménez, G. (2017). Optimization of emulsion properties and enrichment conditions used in live prey enrichment. *Aquaculture Nutrition* 23 (6): 1264-1273. DOI: 10.1111/anu.12501
- FAO (2022). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura en 2022, hacia la transformación azul*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia.
- FAO (2023). *FAO Fisheries & Aquaculture - Sparus aurata (Linnaeus, 1758)*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. [https://firms.fao.org/fi/website/FIRRetrieveAction.do?dom=culturespecies&xml=Sparus\\_aurata.xml&lang=es](https://firms.fao.org/fi/website/FIRRetrieveAction.do?dom=culturespecies&xml=Sparus_aurata.xml&lang=es) [continuamente actualizado; consultado en mayo de 2023].
- Fernández-Reiriz, M. J., Labarta, U. & Ferreira, M. J. (1993). Effects of commercial enrichment diets on the nutritional value of the rotifer (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* 112 (2-3): 195-206. DOI: 10.1016/0044-8486(93)90445-5
- Haga, Y., Du, S.-J., Satoh, S., Kotani, T., Fushimi, H. & Takeuchi, T. (2011). Analysis of the mechanism of skeletal deformity in fish larvae using a vitamin A-induced bone deformity model. *Aquaculture* 315: 26-33. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.11.026
- Hai, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology* 119: 917-935. DOI: 10.1111/jam.12886
- Hamre, K., Krossoy, C. Lock, E.-J. & Moren, M. (2010). Roles of lipid-soluble vitamins during ontogeny of marine fish larvae. *Aquaculture Research* 41: 745-750. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02375.x
- Hamre, K., Yúfera, M., Ronnestad, I., Boglione, C., Conceição, L. E. C. & Izquierdo, M. (2013). Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Reviews in Aquaculture* 5 (1): S26-S58. DOI: 10.1111/j.1753-5131.2012.01086.x
- Hamre, K. (2016). Nutrient profiles of rotifers (*Brachionus* sp.) and rotifer diets from four different marine fish hatcheries. *Aquaculture* 450: 136-142. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.07.016
- Hamza, F., Kumar, A. R., & Zinjarde, S. (2016). Antibiofilm potential of a tropical marine *Bacillus licheniformis* isolate: role in disruption of aquaculture associated biofilms. *Aquaculture Research* 47: 2661–2669. DOI: 10.1111/are.12716
- Hardy, R. W. (2010). Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* 41: 770-776. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x
- Harel, M., Koven, W., Lein, I., Bar, Y., Behrens, P., Stubblefield, J., Zohar, Y. & Place, A. R. (2002). Advanced DHA, EPA and ArA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. *Aquaculture* 213: 347-362. DOI: 10.1016/S0044-8486(02)00047-9
- Hedegaard, R. V. & Skibsted L. H. (2013). Chapter 16: Shelf-life of food powders. In: B. Bhandari (ed.) *Handbook of food powders (Processes and properties)* pp. 409-434. Woodhead Publishing, Cambridge.
- Houston, S., Karalazos, V., Tinsley, J., Tocher, D., Glencross, B. & Monroig, O. (2022). A comparison of regression models for defining EPA + DHA requirements using the gilthead seabream (*Sparus aurata*) as a model species. *Aquaculture* 556: 738308. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.738308

- Hoseinifar, S. H., Sun, Y.-Z., Wang, A. & Zhou, Z. (2018). Probiotics as Means of Diseases Control in Aquaculture, a Review of Current Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology* 9: 2429. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02429
- 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. DOI: 10.1016/j.oneear.2019.10.018
- Izquierdo, M. S. (1996). Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 2: 183-191. DOI: 10.1111/j.1365-2095.1996.tb00058.x
- Izquierdo, M. (2005). Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. In: D. Montero, B. Basurco, I. Nengas, M. Alexis & M. Izquierdo (eds.) *Mediterranean fish nutrition* pp. 91-102. CIHEAM Cahiers Options Méditerranéennes vol. 63, Zaragoza.
- Izquierdo, M., Domínguez, D., Jiménez, J., Saleh, R., Hernández-Cruz, C., Zamorano, M. & Hamre, K. (2019). Interaction between taurine, vitamin E and vitamin C in microdiets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 498: 246-253. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.07.010
- Jannathulla, R., Rajaram, V., Kalanjiam, R., Ambasankar, K., Muralidhar, M. & Syama Dayal, J. (2019). Fishmeal availability in the scenarios of climate change: Inevitability of fishmeal replacement in aquafeeds and approaches for the utilization of plant protein sources. *Aquaculture Research* 50 (12): 3493-3506. DOI: 10.1111/are.14324
- Ji, G., Wang, X. & Wang, L. (2013). Planktonic Rotifers in a Subtropical Shallow Lake: Succession, Relationship to Environmental Factors, and Use as Bioindicators. *The Scientific World Journal* 2013: 702942. DOI: 10.1155/2013/702942
- Kissil, G. W., Cowey, C. B., Adron, J. W. & Richards, R. H. (1981). Pyridoxine requirements of the gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 23 (1-4): 243-255. DOI: 10.1016/0044-8486(81)90018-1
- Kousoulaki, K., Sæther, B.-S., Albrektsen, S. & Noble, C. (2015). Review on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) nutrition and feed management: a practical guide for optimizing feed formulation and farming protocols. *Aquaculture Nutrition* 21: 129-151. DOI: 10.1111/anu.12233
- Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D.-T. & Show, P.-L. (2019). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness* 8: 16-24. DOI: 10.1016/j.fshw.2019.03.001
- Lall, S. P. & Lewis-McCrea, L. M. (2007). Role of nutrients in skeletal metabolism an pathology in fish – An overview. *Aquaculture* 267: 3-19. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.02.053
- Liberti, D., Imbimbo, P., Giustino, E., D'Elia, L., Silva, M., Barreira, L. & Monti, D. M. (2023). Shedding Light on the Hidden Benefit of *Porphyridium cruentum* Culture. *Antioxidants* 12: 337. DOI: 10.3390/antiox12020337
- Maehre, H. K., Hamre, K. & Elvevoll, E. O. (2013). Nutrient evaluation of rotifers and zooplankton: feed for marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 19: 301-311. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2012.00960.x
- Mongile, F., Bonaldo, A., Fontanillas, R., Mariani, L., Badiani, A., Bonvini, E. & Parma, L. (2014). Effects of dietary lipid level on growth and feed utilisation of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) reared at Mediterranean summer temperature. *Italian Journal of Animal Science* 13: 2999. DOI: 10.4081/ijas.2014.2999
- Morris, P. C. & Davies, S. J. (1995). Thiamin supplementation of diets containing varied lipid: carbohydrate ratio given to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Animal Science* 61 (3): 597-603. DOI: 10.1017/S1357729800014193
- Olmos, J. & Paniagua-Michel, J. (2014). *Bacillus subtilis* A Potential Probiotic Bacterium to Formulate Functional Feeds for Aquaculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 6: 361-365. DOI: 10.4172/1948-5948.1000169

- Olmos, J., Acosta, M., Mendoza, G. & Pitones, V. (2020). *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Archives of Microbiology* 202: 427-435. DOI: 10.1007/s00203-019-01757-2
- Olsen, R. L. & Hasan, M. R. (2012). A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology* 27: 120-128. DOI: 10.1016/j.tifs.2012.06.003
- Ortega, A. (2008). *Cuadernos de Acuicultura I: Cultivo de Dorada (Sparus aurata)*. Fundación Observatorio Español de Acuicultura (OESA). Ministerio de Medio Ambiente Rural y Marino, Madrid, España.
- Paulo, M. C., Cardoso, C., Coutinho, J., Castanho, S. & Bandarra, N. M. (2020). Microalgal solutions in the cultivation of rotifers and artemia: scope for the modulation of the fatty acid profile. *Heliyon* 6: e05415. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e05415
- Payne, C. J., Turnbull, J. F., MacKenzie, S. & Crumlish, M. (2022). The effect of oxytetracycline treatment on the gut microbiome community dynamics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) over time. *Aquaculture* 560: 738559. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.738559
- Pimentel-Rodrigues, A. M. & Oliva-Teles, A. (2002). Phosphorus requirements of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquaculture Research* 32 (s1): 157-161. DOI: 10.1046/j.1355-557x.2001.00013.x
- Pousão Ferreira, P. M. (2009). *Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos*. Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (IPIMAR). Oporto, Portugal.
- Pulido-Rodríguez, L. F., Cardinaletti, G., Secci, G., Randazzo, B., Bruni, L., Cerri, R., Olivotto, I., Tibaldi, E. & Parisi, G. (2021). Appetite Regulation, Growth Performances and Fish Quality Are Modulated by Alternative Dietary Protein Ingredients in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Culture. *Animals* 11: 1919. DOI: 10.3390/ani11071919
- Qian, C., Hart, B. & Colombo, S. M. (2020). Re-evaluating the dietary requirement of EPA and DHA for Atlantic salmon in freshwater. *Aquaculture* 518: 734870. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734870
- Radhakrishnan, D. K., AkbarAli, I., Schmidt, B. V., John, E. M., Sivanpillai, S. & Vasunambesan, S. T. (2019). Improvement of nutritional quality of live feed for aquaculture: An overview. *Aquaculture Research* 51: 1-17. DOI: 10.1111/are.14357
- Risjani, Y., Mutmainnah, N., Manurung, M. & Wulan, S. N. (2021). Exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum* (purpureum) is Not Toxic and Stimulates Immune Response against Vibriosis: The Assessment Using Zebrafish and White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Marine Drugs* 19: 133. DOI: 10.3390/md19030133
- Romanova, E., Spirina, E., Romanov, V., Lyubomirova, V. & Shadyeva, L. (2020). Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on catfish in industrial aquaculture. *E3S Web of Conferences* 175: 02013. DOI: 10.1051/e3sconf/202017502013
- Rosado, D., Xavier, R., Severino, R., Tavares, F., Cable, J. & Pérez-Losada, M. (2019). Effects of disease, antibiotic treatment and recovery trajectory on the microbiome of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Scientific Reports* 9: 18946. DOI: 10.1038/s41598-019-55314-4
- Sáez, M. I., Galafat, Vizcaino, A. J., Chaves-Pozo, E., Ayala, M. D., Arizcun, M., Alarcón, F. J., Suárez, M. D. & Martínez, T. F. (2022). Evaluation of *Nannochloropsis gaditana* raw and hydrolysed biomass at low inclusion level as dietary functional additive for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture* 556: 738288. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.738288
- Samartzis, A. (2014). *Organic iron requirements of gilthead sea bream (Sparus aurata)*. University of Plymouth, Plymouth.

- Sanches-Fernandes, G. M. M., Sá-Correia, I. & Costa, R. (2022). Vibriosis Outbreaks in Aquaculture: Addressing Environmental and Public Health Concerns and Preventive Therapies Using Gilthead Seabream Farming as a Model System. *Frontiers in Microbiology* 13: 904815. DOI: 10.3389/fmicb.2022.904815
- Shepherd, C. J. & Jackson, A. J. (2013). Global fishmeal and fish-oil supply: inputs, outputs and markets. *Journal of Fish Biology* 83: 1046-1066. DOI: :10.1111/jfb.12224
- Sivagurunathan, U., Domínguez, D., Tseng, Y., Eryalcin, K., Roo, J., Boglione, C., Prabhu, P. & Izquierdo, M. (2022). Effects of dietary vitamin D3 levels on survival, mineralization, and skeletal development of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 560: 738505. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.738505
- Soltani, M., Ghosh, K., Hoseinifar, S. H., Kumar, V., Lymbery, A. J., Roy, S. & Ringo, E. (2019). Genus *Bacillus*, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 27 (3): 331-379. DOI: 10.1080/23308249.2019.1597010
- Souto, M., Saavedra, M., Pousão-Ferreira, P. & Herrero, C. (2008). Riboflavin enrichment throughout the food chain from the marine microalga *Tetraselmis suecica* to the rotifer *Brachionus plicatilis* and to White Sea Bream (*Diplodus sargus*) and Gilthead Sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 283: 128-133. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2008.06.039
- Tagliavia, M., Salamone, M., Bennici, C., Quatrini, P. & Cuttitta, A. (2019). A modified culture medium for improved isolation of marine vibrios. *Microbiology Open* 8: e835. DOI: 10.1002/mbo3.835
- Toledo, N., Ferrer, J. & Bórquez, R. (2010). Drying and Storage Stability of a Probiotic Strain Incorporated into a Fish Feed Formulation. *Drying Technology* 28 (4): 508-516. DOI: 10.1080/07373931003618444
- UNE, Normalización Española (2014). Normativa UNE-EN ISO 4833-1:2014 – *Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte I: Recuento de colonias a 30 ° C mediante la técnica de siembra en profundidad*. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, febrero de 2014, España.
- Vizcaino, A. J., López, G., Sáez, M. I., Jiménez, J. A., Barros, A., Hidalgo, L., Camacho-Rodríguez, J., Martínez, T. F., Cerón-García, M. C. & Alarcón, F. J. (2014). Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture* 431: 34-43. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.05.010
- Vizcaino, A. J., Rodiles, A., López, G., Sáez, M. I., Herrera, M., Hachero, I., Martínez, T. F., Cerón-García, M. C. & Alarcón, F. J. (2018). Growth performance, body composition, and digestive functionality of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles fed diets including microalgae freeze-dried biomass. *Fish Physiology Biochemistry* 44: 661-677. DOI: 10.1007/s10695-018-0462-8
- Watanabe, W. O., Alam, M. S., Ostrowski, A. D., Montgomery, F. A., Gabel, J. E., Morris Jr., J. A. & Seaton, P. J. (2016). Live prey enrichment and artificial microdiets for larviculture of Atlantic red porgy *Pagrus pagrus*. *Aquaculture Reports* 3: 93-107. DOI: 10.1016/j.aqrep.2016.01.003
- Wells, M. L., Potin, P., Craigie, J. S., Raven, J. A., Merchant, S. S., Helliwell, K. E., Smith, A. G., Camire, M. E. & Brawley, S. H. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology* 29: 949-982. DOI: 10.1007/s10811-016-0974-5
- Yamasaki, T., Aki, T., Mori, Y., Yamamoto, T., Shinozaki, M., Kawamoto, S. & Ono, K. (2007). Nutritional Enrichment of Larval Fish Feed with Traustochytrid Producing Polyunsaturated Fatty Acids and Xantophylls. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104 (3): 200-206. DOI: 10.1263/jbb.104.200
- Zhao, W., Fang, H.-H., Liu, Z.-Z., Chen, J.-M., Zhang, C.-W., Gao, B.-Y. & Niu, J. (2021). Responses in growth performance, enzymatic activity, immune function, and liver health after dietary supplementation of *Porphyridium* sp. in juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Aquaculture Nutrition* 27: 679-690. DOI: 10.1111/anu.13214

## ANEXO I

Protocolo y dosis de aplicación del producto comercial control para enriquecimiento de alimento vivo.

<b>PROTOCOLO DEL PRODUCTO COMERCIAL CONTROL PARA ENRIQUECIMIENTO DE ALIMENTO VIVO</b>		
<b>ROTÍFEROS</b>		
	<b>1ª dosis</b>	<b>2ª dosis</b>
<b>Tiempo de enriquecimiento</b>	3h	3h
<b>Cantidad</b>	0,18 g/L	0,18 g/L

<b>ARTEMIAS</b>		
	<b>1ª dosis</b>	<b>2ª dosis</b>
<b>Tiempo de enriquecimiento</b>	3h	3h
<b>Cantidad</b>	0,75 g/L	0,75 g/L

Protocolo y dosis de aplicación iniciales de las formulaciones ALLarvae para enriquecimiento de alimento vivo.

<b>PROTOCOLO INICIAL DE APLICACIÓN DE LAS FORMULACIONES ALLARVAE PARA ENRIQUECIMIENTO DE ALIMENTO VIVO</b>		
<b>ROTÍFEROS</b>		
	<b>1ª dosis</b>	<b>2ª dosis</b>
<b>Tiempo de enriquecimiento</b>	13h	3h
<b>Cantidad</b>	0,2 g/L	0,1 g/L

<b>ARTEMIAS</b>		
	<b>1ª dosis</b>	<b>2ª dosis</b>
<b>Tiempo de enriquecimiento</b>	13h	3h
<b>Cantidad</b>	1,2 g/L	0,6 g/L

## ANEXO II

Planificación y eventos del ensayo de cultivo de larvas de dorada (*Sparus aurata*) en la EPPO (IPMA).

Días después de la eclosión de los huevos (DDE)	Observaciones
0	Eclosión Medición de longitud y peso seco de las larvas
1	--
2	--
3	Medición de longitud y peso seco de las larvas Microbiología agua tanques cultivo larvario Microbiología tracto gastrointestinal larvas
4	Abertura boca larvas Inicio alimentación con rotíferos
5	--
6	--
7	--
8	--
9	--
10	--
11	--
12	--
13	--
14	--
15	Medición de longitud y peso seco de larvas Medición de insuflación de vejiga en larvas Microbiología agua tanques cultivo larvario Microbiología tracto gastrointestinal larvas
16	Inicio alimentación con artemia AF
17	--
18	Inicio administración antibiótico por mortalidad elevada generalizada

19	--
20	--
21	Inicio alimentación con artemia EG
22	--
23	--
24	Medición de longitud y peso seco de las larvas Medición de insuflación de vejiga en larvas Microbiología tracto gastrointestinal larvas Fin alimentación con rotíferos
25	Inicio alimentación con pienso
26	Fin administración antibiótico
27	--
28	--
29	--
30	--
31	--
32	--
33	Microbiología tracto gastrointestinal larvas
34	--
35	--
36	--
37	Medición de longitud y peso seco de las larvas
38	Ensayo estrés por transporte

---

### ANEXO III

Asignación de los tanques de cultivo larvario de dorada (*Sparus aurata*) para cada uno de los tratamientos (producto control, ALLarvae 2.0 y ALLarvae 2.0 POC) durante el ensayo realizado en la EPPO (IPMA).

Tanque	Tratamiento
T1	ALLarvae 2.0
T2	ALLarvae 2.0 POC
T3	Control
T4	Control
T5	ALLarvae 2.0 POC
T6	ALLarvae 2.0
T7	ALLarvae 2.0 POC
T8	Control
T9	ALLarvae 2.0

## ANEXO IV

Análisis de caracterización microbiológica del producto comercial control de enriquecimiento y de las diferentes formulaciones piloto ALLarvae de acuerdo con los análisis realizados por la empresa Microal (Sevilla, España).

Producto	Mesófilos aerobios (UFC/g)	<i>Vibrio</i> sp. (UFC/25g)	<i>Salmonella</i> sp. (UFC/25g)	Hongos/ Levaduras (UFC/g)	<i>Enterobacter</i> sp. (UFC/25g)	<i>Escherichia coli</i> (UFC/25g)
<b>Control</b>	$3,20 \cdot 10^3$	0	0	< 10 / < 10	< 10	< 10
<b>ALLarvae 1.0</b>	$8,6 \cdot 10^6$	0	0	< 10 / $4,6 \cdot 10^4$	< 10	< 10
<b>ALLarvae 1.0 POC</b>	$5,3 \cdot 10^6$	0	0	< 10 / $1,6 \cdot 10^4$	< 10	< 10
<b>ALLarvae 2.0</b>	$1,4 \cdot 10^8$	0	0	< 10 / $3,3 \cdot 10^6$	< 10	< 10
<b>ALLarvae 2.0 POC</b>	$5,3 \cdot 10^8$	0	0	< 10 / $1,6 \cdot 10^4$	< 10	< 10

Análisis de presencia de metales pesados del producto comercial control de enriquecimiento y de las diferentes formulaciones piloto ALLarvae de acuerdo con los análisis realizados por la empresa Microal (Sevilla, España).

Producto	Mercurio (mg/kg)	Cadmio (mg/kg)	Plomo (mg/kg)	Arsénico (mg/kg)
<b>Control</b>	< 0,1	< 0,010	< 0,020	< 0,1
<b>ALLarvae 1.0</b>	< 0,1	< 0,010	< 0,020	< 0,1
<b>ALLarvae 1.0 POC</b>	< 0,1	< 0,010	< 0,020	< 0,1
<b>ALLarvae 2.0</b>	< 0,1	< 0,010	< 0,020	< 0,1
<b>ALLarvae 2.0 POC</b>	< 0,1	< 0,010	< 0,020	< 0,1