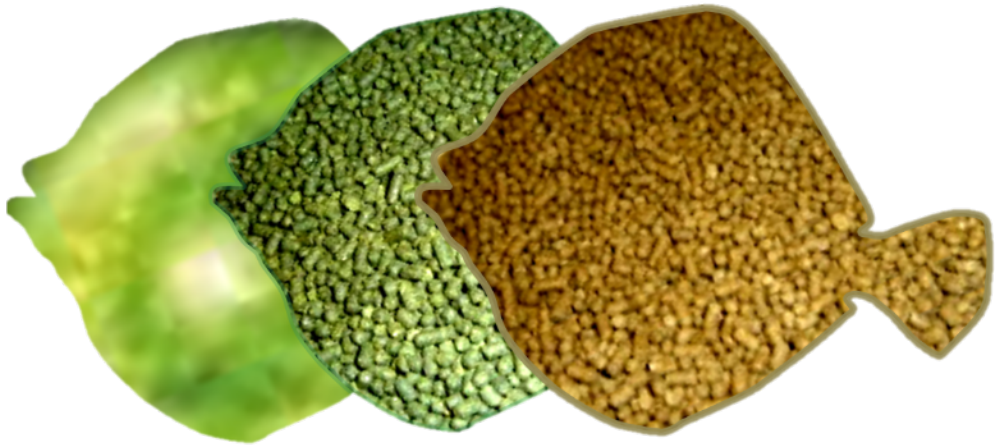


MANUAL

(uso didáctico)



Algadiet II



VICEPRESIDENCIA
TERCERA DEL GOBIERNO
MINISTERIO
PARA LA TRANSICIÓN ECOLÓGICA
Y EL RETO DEMOGRÁFICO



Unión Europea

Fondo Europeo Marítimo y
de Pesca (FEMP)

Con la colaboración de la Fundación Biodiversidad, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar, cofinanciado por el FEMP.

Entidades socias:



INSTITUTO
ESPAÑOL DE
OCEANOGRAFÍA



Universidad
de Cádiz



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Entidades colaboradoras:



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

uma.es

Este manual se ha evaluado con fines didácticos, contiene el proceso seguido para el muestreo de los rodaballos de experimentación del proyecto ALGADIET II. No pretende ser una descripción exhaustiva de este proceso.

En la elaboración de este manual han participado:

Alma Hernández de Rojas CN-Instituto Español de Oceanografía – CSIC, Centro Oceanográfico de Gijón. alma.hernandez@ieo.csic.es

M del Carmen Castro Pérez CN-Instituto Español de Oceanografía – CSIC, Centro Oceanográfico de Gijón.

Cristina Rodríguez Rodríguez CN-Instituto Español de Oceanografía – CSIC, Centro Oceanográfico de Santander, planta de Cultivos El Bocal.

Juan Manuel Martínez Vázquez CN-Instituto Español de Oceanografía – CSIC, Centro Oceanográfico de Santander, planta de Cultivos El Bocal.

M. del Mar Díaz Saiz CN-Instituto Español de Oceanografía – CSIC, Centro Oceanográfico de Santander, planta de Cultivos El Bocal.

Todo el personal de apoyo de la planta de Cultivo de El Bocal (Santander). Sin su trabajo no hubiese sido posible la realización de la experimentación animal.

Agradecer al Dr. Miguel Ángel Moriñigo por ceder desinteresadamente su cepa probiótica *Shewanella putrefaciens* pdp11

Tabla de contenido

1 INTRODUCCIÓN	4
2 EXPERIMENTACIÓN	6
2.1. ENSAYO <i>INVIVO</i> DE PIENSOS CON MACRO Y MICROALGAS.	6
2.2. ENSAYO <i>INVIVO</i> DE PIENSOS CON MICROALGAS Y PROBIÓTICOS.	7
3 MUESTREO	8
4 ANESTESIA	9
5 EXTRACCIÓN DE SANGRE Y OBTENCIÓN DEL PLASMA	10
6 EVISCERACIÓN	11
7 EXTRACCIÓN DEL RIÑÓN CEFÁLICO	12
7 EXTRACCIÓN DEL RIÑÓN CEFÁLICO	13
8 MUESTREO DEL MÚSCULO	14
9 CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	14
BIBLIOGRAFÍA	16

1 INTRODUCCIÓN

En el año 2020, la producción pesquera y acuícola mundial alcanzó el récord de 214 millones de toneladas, 178 millones de toneladas de animales acuáticos y 36 millones de toneladas de algas [1]. Solamente la producción acuícola mundial en 2020 alcanzó la cifra de 87,5 millones de toneladas de animales acuáticos lo que supuso un valor económico de 264.800 millones de USD. Esto supone que la contribución de la producción mundial acuícola fue de un 49,2% al total de la producción mundial de organismos acuáticos (Figura 1). A pesar de este crecimiento en la producción acuícola, existen una serie de retos que deben de abordarse para que este crecimiento continúe siendo sostenible y respetuoso con el medio ambiente.

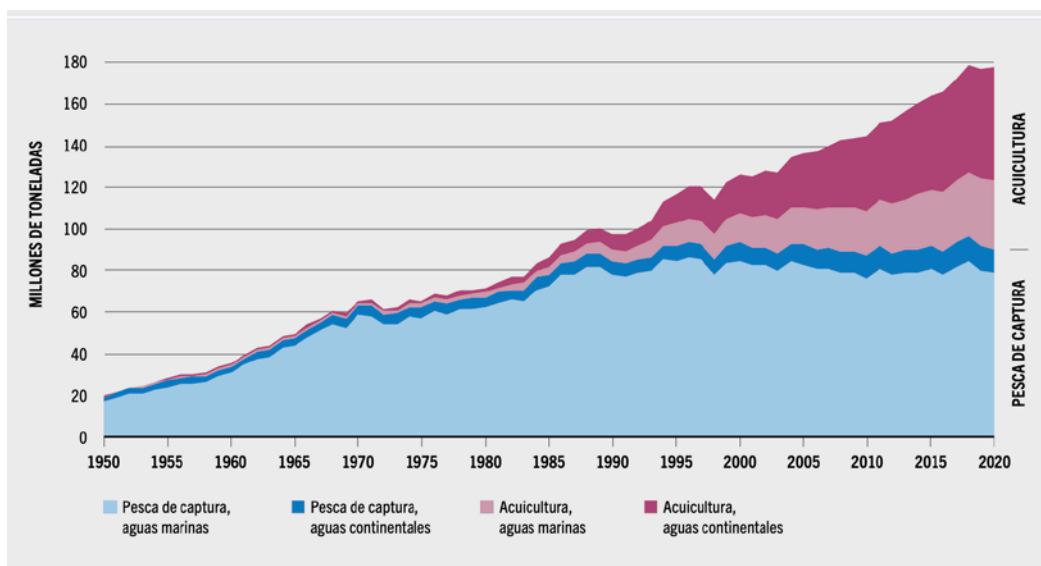


Figura 1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura. Excluidos los mamíferos acuáticos, los cocodrilos, los lagartos, los caimanes y las algas. Los datos se expresan en términos de equivalente en peso vivo. FUENTE FAO

Uno de los mayores segmentos del sector productivo acuícola es el de los ingredientes para piensos, que supone más el 60 % del coste total de la producción. Entre las materias primas que son necesarias se encuentran las harinas (HP) y aceites de pescado (AP), que aportan proteína de alta calidad y son una fuente natural de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) esenciales. Estos dos ingredientes se elaboran a partir de varias especies de pescado, principalmente pequeños pelágicos como la anchoveta (*Engraulis ringens*), bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), sardina (*Sardina pilchardus*), caballa (*Scomber scombrus*) y arenque (*Clupea harengus*), entre otros. La producción de estos ingredientes no es constante, variando en función de la fluctuación en las capturas. En el año 1994 se alcanzó el nivel máximo de pescado procesado para su transformación en HP y AP, más de 30 millones de toneladas, momento a partir del cual esta producción ha tenido una tendencia decreciente. A pesar de esto, en el año 2020 cerca del 20 % de las capturas mundiales de pescado se utilizaron para la producción de estos ingredientes [1]. Esta reducción en la producción de HP y AP unido a un aumento en la demanda de estos ingredientes para la producción de piensos, debido al crecimiento de la actividad

acuícola supone que los precios en el mercado aumenten paulatinamente. Debido a todo esto, en la actualidad se está investigando en la búsqueda de fuentes alternativas de ácidos grasos poliinsaturados, entre los que cabe destacar el uso de algas (micro y macroalgas).

El segundo reto al que se enfrenta la acuicultura es el de minimizar su impacto ambiental reduciendo el uso de compuestos antimicrobianos y asegurándose que los residuos de éstos sean mínimos, disminuyendo así el riesgo de que microorganismos patógenos desarrollen resistencias. Además, existe una gran demanda en el sector acuícola de productos terapéuticos que garanticen la sostenibilidad en lo referente a la prevención de la aparición de enfermedades nuevas y/o emergentes. Estos dos aspectos hacen imprescindible el desarrollo de enfoques proactivos basados en el uso de nutracéuticos y preventivos naturales que promuevan la salud y el bienestar animal. Entre estas alternativas se encuentran el empleo de microorganismos probióticos capaces de modular la microbiota intestinal y generar ventajas fisiológicas en el hospedador.

El proyecto ALGADIET II se ha desarrollado para dar respuesta estos dos retos en el cultivo de la especie marina rodaballo (*Scophthalmus maximus*) hasta su tamaño comercial (engorde). Por una parte se estudiaron piensos en los que se sustituyó el 5% de HP y AP por microalgas y macroalgas. La elección de este porcentaje de sustitución se debe a los resultados obtenidos en proyecto ALGADIET (2018), en el que se estudiaron dos porcentajes de sustitución, 5 y 10%, observándose que el primero era el que proporcionaba mejores resultados. El ensayo tuvo una duración de 6 meses, durante los cuales se estudiaron parámetros zootécnicos, fisiológicos, nutricionales, metabólicos, entre otros. Tras analizar los resultados, se decidió que el pienso con microalgas al 5% sería el seleccionado para el segundo experimento.

En un segundo experimento, que tuvo una duración de 2 meses, se formularon 3 piensos con una sustitución al 5% de HP y AP por microalgas a los que se adicionaron tres microorganismos probióticos: dos bacterias lácticas (*Lactococcus lactis* BAL13 y *Lactobacillus plantarum* BAL4) aislados en nuestro laboratorio y un microorganismo gran negativo (*Shewanella putrefaciens* pDP11) aislado en el laboratorio del Dr. Miguel Ángel Moriñigo (Universidad de Málaga) con propiedades probióticas demostradas [2, 3].

2 EXPERIMENTACIÓN

En este proyecto se formularon y evaluaron dos tipos de piensos:

- 1) Pienso en el que se ha sustituido el 5% de las harinas y aceites de pescado por macro y microalgas.
- 2) Pienso en el que se ha sustituido el 5% de la harina y aceite de pescado por microalgas y a los que se les ha adicionado probióticos.

En la figura 2 se muestra un resumen de los dos ensayos que se realizaron dentro del marco del proyecto ALGADIET II.

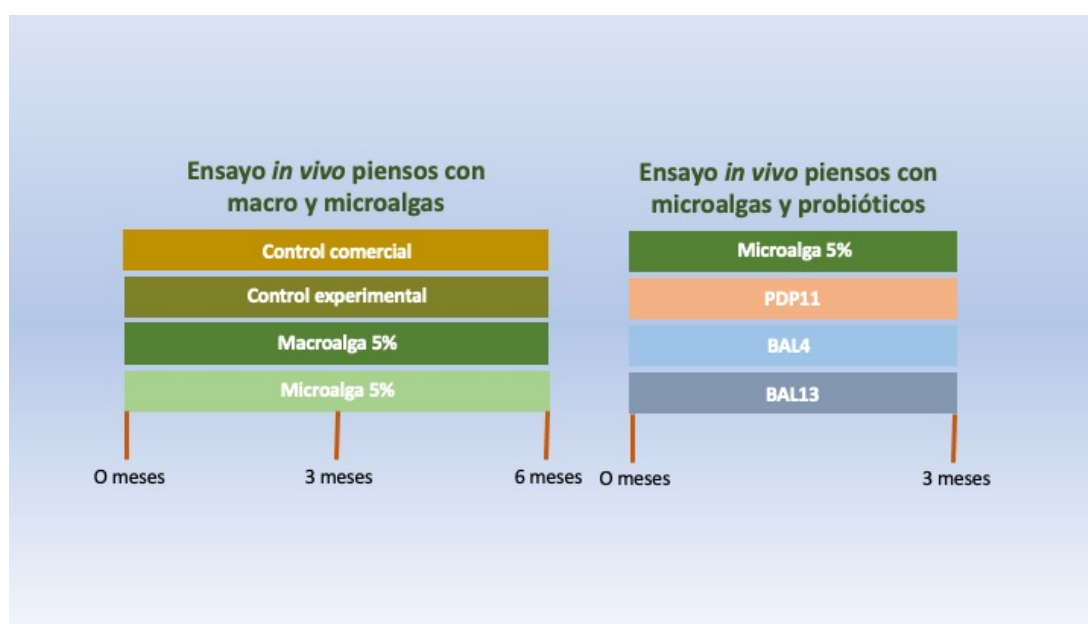


Figura 2. Experimentos realizados dentro del Proyecto ALGADIET.

2.1. ENSAYO *INVIVO* DE PIENSOS CON MACRO Y MICROALGAS.

Para la evaluación *in vivo* del efecto de los piensos funcionales con micro y macroalgas en el crecimiento, metabolismo y salud de alevines de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) hasta su tamaño comercial, se utilizaron 480 alevines de rodaballo procedentes del Instituto Gallego de Formación en Acuicultura (IGAFa) que se trasladaron a la Planta de Cultivos Marinos El Bocal del CN-Instituto Español de Oceanografía de Santander. Los peces se distribuyeron aleatoriamente en 12 tanques de fibra cilíndricos de 500 L, en circuito abierto con un caudal de 2 L/min (lo que supone algo más de 6 renovaciones completas diarias), con aireación moderada y fotoperiodo de 16L:8O. La alimentación fue manual *ad libitum*, 2 veces al día con pienso comercial específico para esta especie.

En estas condiciones se mantuvieron en cuarentena durante un mes. Trascurrido este periodo de aclimatación se realizó el muestreo de talla y peso de todos los peces que se correspondió con el inicio del experimento. La densidad inicial media del cultivo fue de 1 kg/m².

A partir de este momento, los peces se mantienen con las mismas condiciones que durante la cuarentena; en este momento el alimento suministrado fue de 3 dietas experimentales formuladas y elaboradas por la Unidad de Piensos Experimentales de la Universidad de Almería (Control, Micro 5 y Ulva 5) 1 dieta. Se trabajó con triplicados para cada dieta.

Diariamente se registraron los parámetros de temperatura, niveles de oxígeno y se realizaron las tareas de sifonado, limpieza de tanques, así como la revisión del estado de los ejemplares, procediendo a anotar cualquier anomalía que se detectara tanto en el aspecto exterior de los peces como en su comportamiento.

2.2. ENSAYO *INVIVO* DE PIENSOS CON MICROALGAS Y PROBIÓTICOS.

Para la evaluación *in vivo* del efecto de los piensos experimentales suplementados con probióticos en el crecimiento, metabolismo y salud durante la fase de engorde de rodaballo (*Scophthalmus maximus*), se utilizaron 240 ejemplares de rodaballo procedentes del Instituto Gallego de Formación en Acuicultura (IGAFA) que se trasladaron a la Planta de Cultivos Marinos El Bocal del CN-Instituto Español de Oceanografía de Santander. Los peces se distribuyeron aleatoriamente en 12 tanques de fibra cilíndricos de 500 L, en circuito abierto con un caudal de 2 L/min (lo que supone algo más de 6 renovaciones completas diarias), con aireación moderada y fotoperiodo de 16L:8O. La alimentación fue manual *ad libitum*, 2 veces al día con pienso comercial específico para esta especie.

Diariamente se registraron los parámetros de temperatura, salinidad, niveles de oxígeno y se realizaron las tareas de sifonado, limpieza de tanques, así como la revisión del estado de los ejemplares, procediendo a anotar cualquier anomalía que se detectara tanto en el aspecto físico del pez como en su comportamiento.

En estas condiciones se mantuvieron en cuarentena durante un mes. Trascurrido este periodo de aclimatación se realizó el muestreo de talla y peso de todos los peces momento que correspondió con el inicio del experimento. La densidad inicial media del cultivo fue de 24 kg/m² (la densidad media de cultivo en el engorde de rodaballo en empresa varía entre 20 y 40 kg/m²).

Después de este periodo, los peces se mantienen con las mismas condiciones que durante la cuarentena; en este momento el alimento suministrado fue de 4 dietas experimentales formuladas y elaboradas por la Unidad de Piensos Experimentales de la Universidad de Almería:

- i) Control (M5 con sustitución del 5% de harina y aceite de pescado por harina de microalgas, mejor dieta del experimento anterior),
- ii) BAL4 dieta control suplementada con la bacteria probiótica *Lactobacillus plantarum*,
- iii) BAL13 dieta control suplementada con la bacteria probiótica *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y

- iv) PDP11 dieta control suplementada con la bacteria *Shewanella putrefaciens* pdp11.

Se trabajó con triplicados; la cantidad de alimento suministrado durante el primer mes fue el 1 % de la biomasa de cada tanque y durante el segundo mes el 0,5 %.

Diariamente se registraron los parámetros de temperatura, niveles de oxígeno y se realizaron las tareas de sifonado, limpieza de tanques, así como la revisión del estado de los ejemplares, procediendo a anotar cualquier anomalía que se detectara tanto en el aspecto exterior de los peces como en su comportamiento.

El experimento tuvo una duración de 2 meses. Mensualmente se realizaron muestreos de talla y peso de todos los peces tras de un ayuno de 24 h. obteniéndose los datos de crecimiento; con estos datos se calcularon los mismos índices que en el experimento anterior.

3 MUESTREO

Todos los procesos de manejo y sacrificio de los animales se llevaron a cabo de acuerdo con el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Se procedió a realizar muestreo de los animales a los 3 y 6 meses en el caso del primer experimento y a los 2 meses en el caso del segundo.

Se muestrearon 5 peces de cada tanque para la extracción de muestras de sangre, intestino, riñón cefálico, hígado y músculo para la determinación posterior de parámetros metabólicos, inmunitarios, antiinflamatorios, enzimas digestivas e histología.

Antes del sacrificio de los animales por sobredosis de anestésico (500 ppm eugenol disuelto en alcohol etílico en una relación 1:10), los peces se anestesiaron individualmente con 80 ppm de aceite de clavo (eugenol). Se procedió a extracción de sangre con jeringuillas heparinizadas desde las branquias, para el estudio de niveles de cortisol. La sangre se centrifugó a 4°C, 5000 g y durante 5 minutos, se tomó el plasma que se conservó a – 80 °C hasta su análisis.

A continuación, y tras la eutanasia, se realizó la disección de los individuos a los que se extrajo y presó el paquete visceral completo, separando posteriormente el hígado, para obtener su peso específico, y finalmente determinando la longitud del intestino completamente estirado.

- Músculo para el estudio de composición corporal mediante análisis de proteínas, lípidos y perfil de ácidos grasos.
- Hígado y riñón cefálico para estudios de expresión de genes relacionados con parámetros metabólicos, inmunitarios tanto antiinflamatorios como anti estrés.

- Músculo e hígado para el estudio de metabolitos plasmáticos: Glucosa, Lactato, Triglicéridos y Proteínas totales.
- Muestreo de intestino anterior y posterior para estudio histológico mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión y barrido.
- Muestreo de sistema digestivo completo y con alimento para el estudio de la actividad enzimática.

En el siguiente vídeo, se puede ver este proceso:

<https://www.youtube.com/watch?v=8CfG0A1k-9w&t=11s>

4 ANESTESIA

Antes del sacrificio de los animales por sobredosis de anestésico (500 ppm eugenol disuelto en alcohol etílico en una relación 1:10), los peces se anestesiaron individualmente con 80 ppm de aceite de clavo (eugenol) mediante inmersión [4]. En la Figura 3 se puede ver cómo se realizó este proceso en el laboratorio.

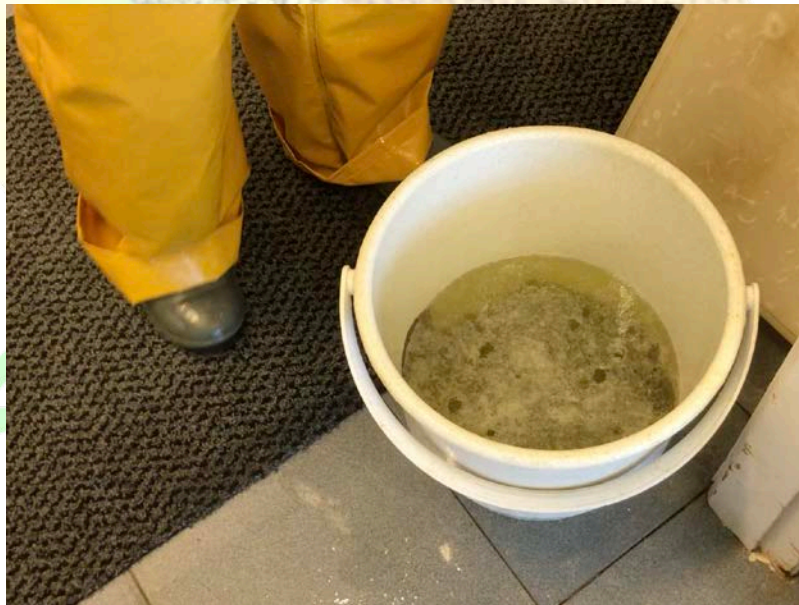
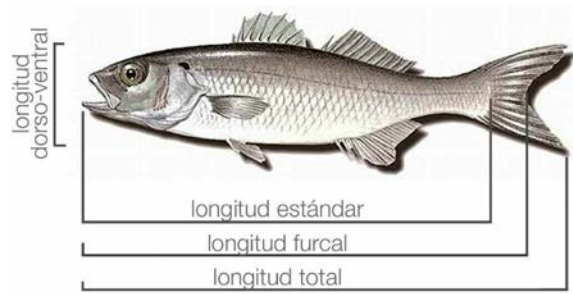


Figura 3. Anestesia de los rodaballos mediante inmersión en disolución de eugenol (aceite de clavo) en alcohol etílico, 80 ppm.

Una vez anestesiados, los animales se mide su longitud total (Figura 4) (usando un ictiómetro) y pesan en balanza (Figura 5).



A



B

Figura 5. Tipos de medidas de la longitud de un pez. Tomado de “Evaluación de la presencia de nematodos del género *Anisakis* en los pescados de acuicultura marina españoles” APROMAR (2012) (A) y medición de la longitud total o talla en ictiometro (B).

5 EXTRACCIÓN DE SANGRE Y OBTENCIÓN DEL PLASMA

Una vez anestesiados, los animales se trasladan hasta el laboratorio donde, en primer lugar, se procede a la extracción de la sangre.

Se emplearon jeringuillas heparinizadas, y la sangre se extrajo de la vena caudal o, si esto no fue posible, del arco branquial (Figura 6). La sangre extraída se introduce en microtubos y se conserva a 4°C hasta que se han obtenido un número suficiente de muestras para proceder al siguiente paso.

Para separar el plasma del resto de los componentes de la sangre, se centrifugan los microtubos a 15.000 rpm durante 15 min a 4°C (Figura 7).



Figura 6. Extracción de sangre de la vena caudal (A) y del arco branquial (B) de los animales.

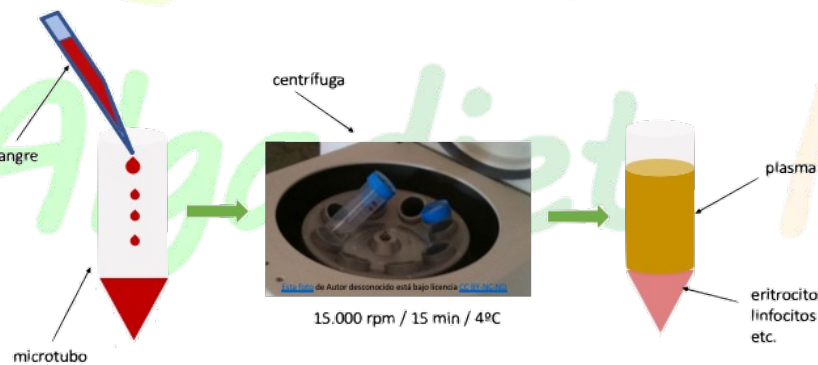


Figura 7. Proceso de separación del plasma del resto de los componentes de la sangre.

6 EVISCERACIÓN

Para poder obtener el resto de las muestras se procede a eviscerar al animal, previa eutanasia. Todo el material empleado estaba limpio y esterilizado mediante llama de mechero, y el procedimiento se realizó de manera aséptica.

En primer lugar, se limpia la zona abdominal con alcohol etílico para después abrirla utilizando unas tijeras limpias y se saca el paquete visceral, compuesto por el hígado y el intestino (Figura 8).

El hígado se separa del tubo digestivo, para obtener finalmente el intestino (Figura 9).

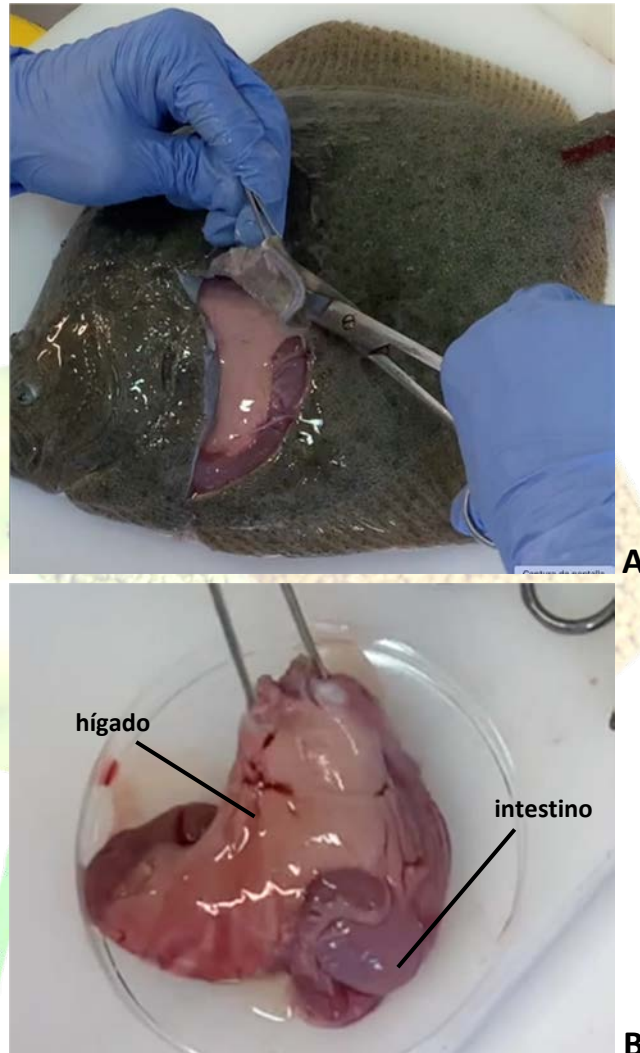


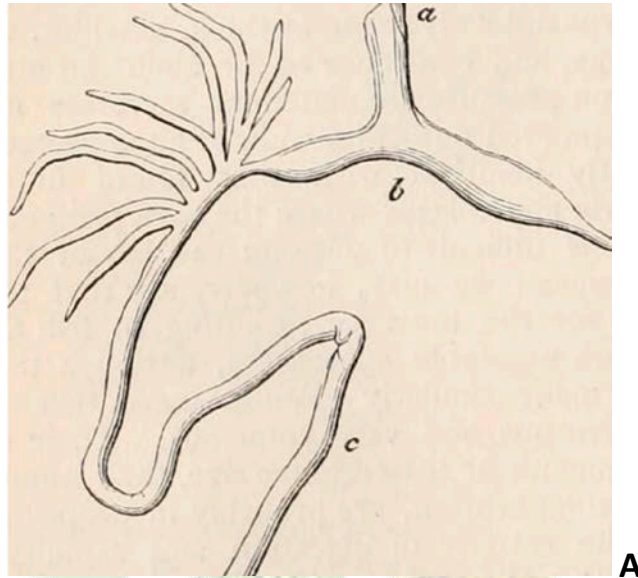
Figura 8. Proceso de evisceración de los rodaballos: apertura de la zona abdominal (A) y extracción del paquete visceral (B) donde podemos apreciar el hígado y parte del intestino.

Utilizando un bisturí limpio, se obtienen porciones del hígado que serán utilizadas para analizar.

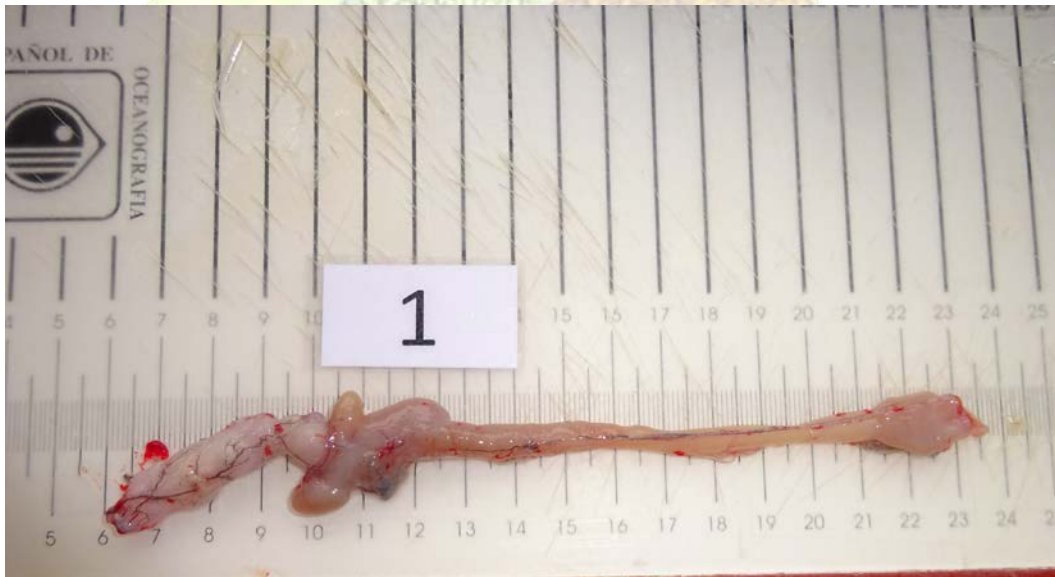
De igual manera, el intestino es procesado para su posterior análisis.

7 EXTRACCIÓN DEL RIÑÓN CEFÁLICO

Después de la evisceración, se limpia la cavidad abdominal del animal y se extrae el riñón cefálico de la parte posterior de la cabeza, adherido a la espina dorsal, utilizando un bisturí y pinza limpios (Figura 10).



A



B

Figura 9. Partes del tubo digestivo de rodaballo (A): a ciegos pilóricos, b estómago y c intestino. Intestino de rodaballo separado y limpio (B).

7 EXTRACCIÓN DEL RIÑÓN CEFÁLICO

Después de la evisceración, se limpia la cavidad abdominal del animal y se extrae el riñón cefálico de la parte posterior de la cabeza, adherido a la espina dorsal, utilizando un bisturí y pinza limpios (Figura 10).



Figura 10. Extracción del riñón cefálico.

8 MUESTREO DEL MÚSCULO

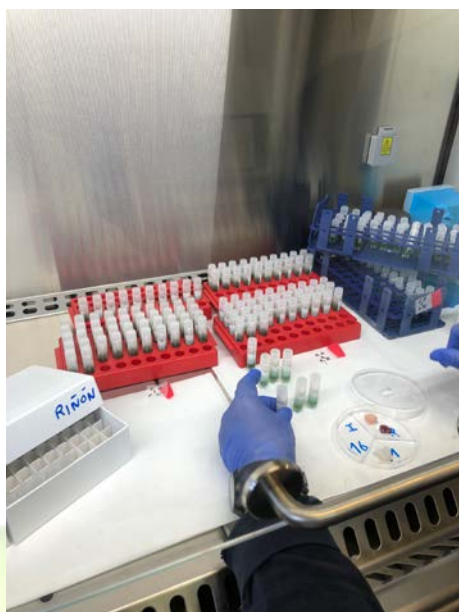
Utilizando un bisturí y pinza limpia, se extrae de la parte dorsal-ocular una porción de músculo del animal (Figura 11).



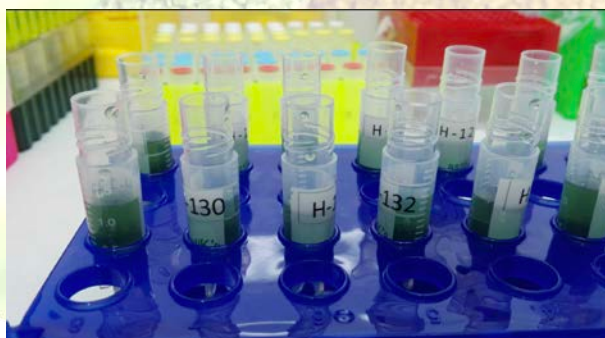
Figura 7. Extracción de músculo de rodaballo.

9 CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras son conservadas en tubos crioviales y se guardan a -80°C . En los crioviales se ha añadido un volumen suficiente para cubrir las, de un reactivo que las conserva hasta su posterior análisis en el laboratorio. Todas las muestras son clasificadas y numeradas (Figura 12).



A



B

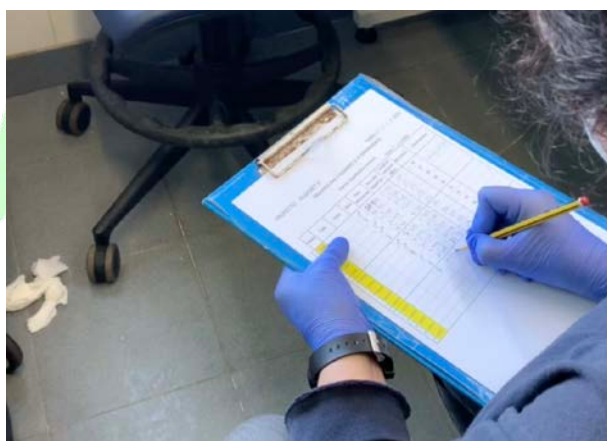
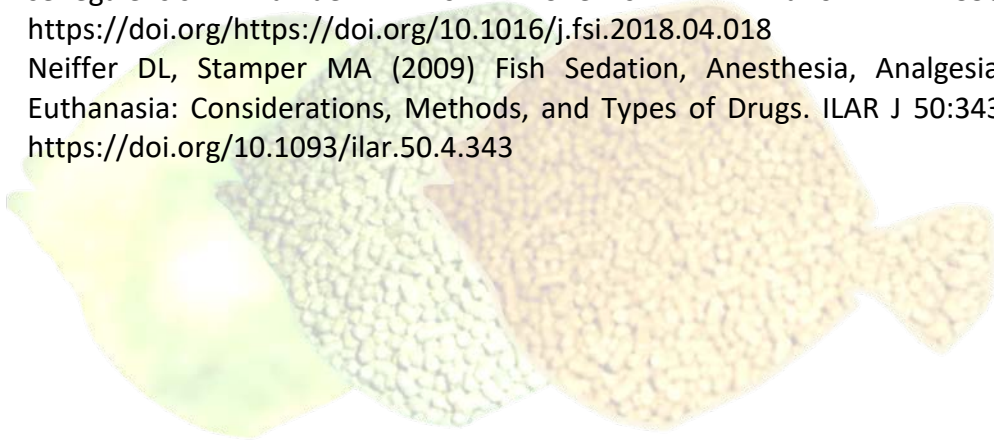


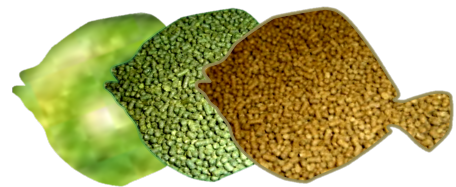
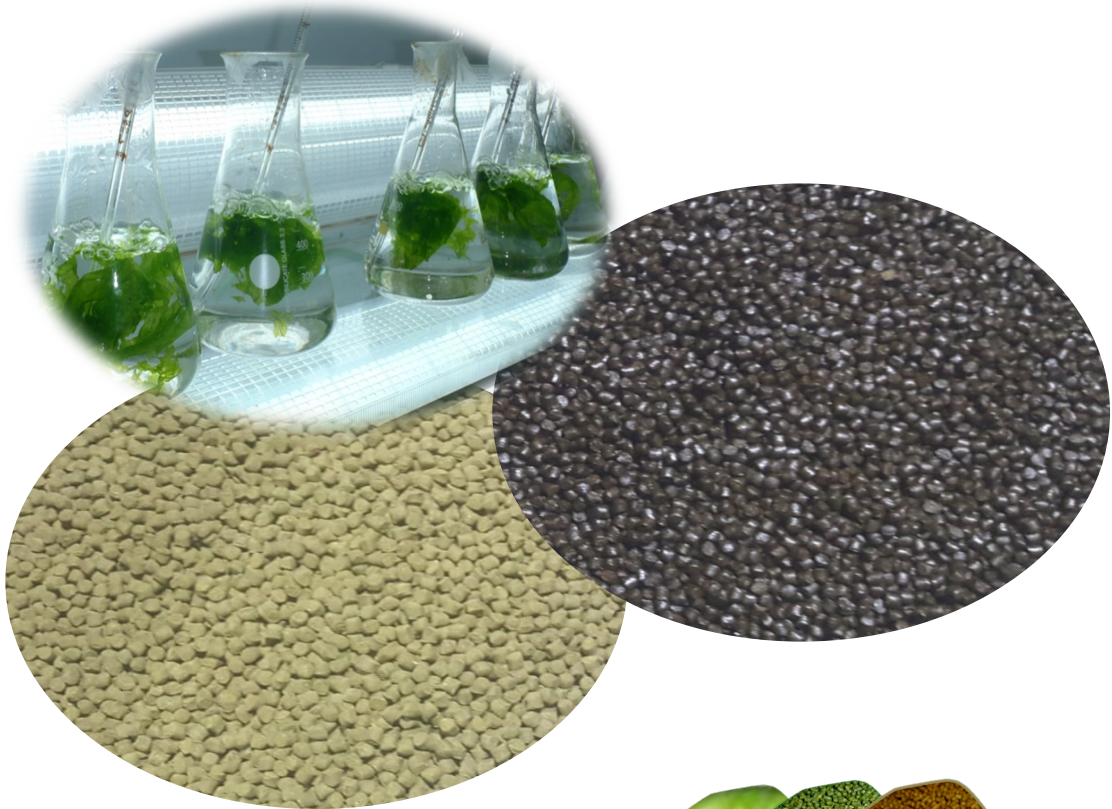
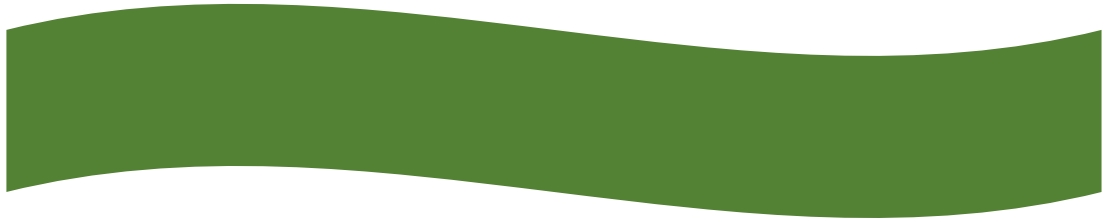
Figura 12. Conservación de las muestras en los crioviales (A) crioviales con reactivo conservante (B) clasificación de las muestras (C).

BIBLIOGRAFÍA

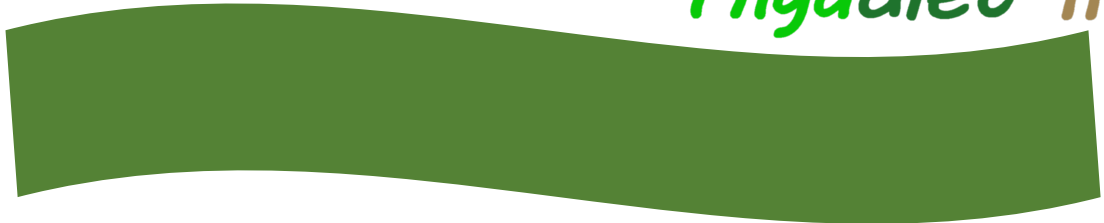
1. FAO (2022) The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. FAO, Roma
2. Alonso S, Carmen Castro M, Berdasco M, et al (2019) Isolation and Partial Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Gut Microbiota of Marine Fishes for Potential Application as Probiotics in Aquaculture. *Probiotics Antimicrob Proteins* 11:569–579. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9439-2>
3. Jurado J, Villasanta-González A, Tapia-Paniagua ST, et al (2018) Dietary administration of the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 promotes transcriptional changes of genes involved in growth and immunity in *Solea senegalensis* larvae. *Fish Shellfish Immunol* 77:350–363. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.018>
4. Neiffer DL, Stamper MA (2009) Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs. *ILAR J* 50:343–360. <https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.343>



Algadiet II



Algadiet II



ALGADIET II: Desarrollo y optimización de nuevos piensos funcionales, basados en el uso de harinas de algas y probióticos, para el engorde de rodaballo | Pleamar (programapleamar.es)