Utilización de Algas como Ingrediente Alternativo en la Alimentación de Peces Marinos

A.J.Vizcaíno[1], J.A.Jiménez [1], J.Camacho[2], A.M. Barros [1], G. López [1], L. Hidalgo[1], M.I.Sáez [1], F.G.Acién [2], M.C.Cerón [2], T.F.Martínez [1] y F.J. Alarcón [1]

Dpto. Biología y Geología [(1)] y Dpto. Ingeniería [(2)], Escuela Politécnica Superior y Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Almería-CEIA$_3$, España.

Resumen

El empleo de las algas en acuicultura tiene un gran potencial por la creciente preocupación de hacer un uso de los recursos naturales más sostenible y respetuoso con el medio ambiente. Su aplicación en la alimentación de peces tiene interés desde una doble perspectiva; i) reduciendo la dependencia de insumos derivados de las pesquerías, y ii) mejorando el estado de condición de los animales. Como ejemplo aplicado de esta temática, en el presente estudio se evalúa el potencial de la microalga *Scenedesmus almeriensis* como ingrediente alternativo a la harina de pescado en la alimentación de la dorada (*Sparus aurata*, L.). En un experimento *in vivo* se ensayan cinco dietas experimentales en las que se sustituye la proteína de la harina de pescado por biomasa liofilizada de microalga a distintos niveles, y se analiza 1) el crecimiento de los peces y el aprovechamiento nutritivo, 2) la influencia en la composición química y en el perfil de ácidos grasos, 3) los efectos que ejerce en la estructura del hígado e intestino, 4) el efecto sobre diversas actividades enzimáticas digestivas y sobre la ultraestructura de la mucosa intestinal, y finalmente, 4) se realiza una valoración económica de su utilización en piensos para acuicultura.

Palabras clave: dorada, enzimas digestivas, evaluación nutritiva, intestino, algas, peces marinos, *Scenedesmus almeriensis.*

Alarcón *et al.* 2013. Utilización de Algas como Ingrediente Alternativo en la Alimentación de Peces Marinos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 127-190.

Introducción

Las distintas especies que se cultivan tienen que ser alimentadas en función de sus necesidades nutricionales y fisiológicas intrínsecas. Por ejemplo, los peces y crustáceos marinos presentan como norma general una dieta carnívora. Debido a ello, históricamente los principales ingredientes utilizados en la elaboración de alimentos para peces cultivados han sido la harina y el aceite de pescado, procedente de peces capturados en las principales pesquerías del mundo. Por ejemplo, por cada kg producido de salmón, de otros peces o de langostinos se deben de consumir como alimento entre 2,5 y 5 kg de otras especies de peces (Naylor *et al.*, 2000). En el caso de las granjas de atún, este valor es aún más elevado, hasta 20 kg por cada kg de biomasa producida (Volpe, 2005). Esto hace que el cultivo de peces carnívoros requiera en la mayoría de las ocasiones de más biomasa de la que se produce en las granjas (Tacon & Forster, 2003). Y por ello, en vez de aliviar la presión sobre las pesquerías, el incremento en la producción de especies carnívoras puede incrementar la presión sobre las poblaciones de peces que viven en su medio natural. Es probable que, como consecuencia de una mayor intensificación de la acuicultura, así como de la diversificación de las especies cultivadas, la demanda de harina y de aceite de pescado llegue a superar la oferta actual, lo cual es, sin duda alguna, insostenible.

La harina y el aceite de pescado son materias primas cuya comercialización está globalizada. Para producir estos insumos se utilizan cerca de 28 millones de toneladas de pescado (un 30% de las capturas mundiales) y 5 millones de toneladas de desechos que se generan durante el procesado del pescado destinado al consumo humano. La industria de alimentos para organismos acuáticos utiliza cerca del 50% de la producción mundial de harina de pescado, y más del 80% de la producción de aceite de pescado (FAO, 2010). La disponibilidad de harina de pescado depende básicamente de las capturas, además de que un importante porcentaje de la pesca de especies usadas para la elaboración de la harina de pescado actualmente se destina a consumo humano. En este contexto, la utilización de la harina de pescado como fuente de proteína mayoritaria en los piensos para acuicultura puede llegar a ocasionar un incremento en los costes de producción en acuicultura a la par que determina que este sector no llegue a ser una actividad sostenible, al precisar para su

Alarcón *et al.* 2013. Utilización de Algas como Ingrediente Alternativo en la Alimentación de Peces Marinos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 127-190.

crecimiento de mayor cantidad de derivados de la pesca extractiva. Por todo esto, y teniendo en cuenta las recomendaciones de la FAO en las que se pedía la disminución en el uso de harinas y aceites procedentes de la pesca extractiva para producir alimentos en acuicultura, se inició un importante esfuerzo en la búsqueda de fuentes proteicas alternativas que pudieran reemplazar total o parcialmente a este insumo en la elaboración de los alimentos (Silva *et al*., 2010).

En la selección de fuentes proteicas alternativas es necesario tener en cuenta que éstas sean sostenibles y renovables, y que no ocasionen efectos negativos en el pez. En este contexto, las algas (tanto microalgas como macroalgas) despiertan cada vez más un mayor interés como posibles ingredientes en las dietas para peces, como fuente alternativa de proteínas, y de aporte complementario de vitaminas y lípidos. Sin embargo, su cultivo intensivo aún resulta costoso, lo que es un factor a tomar en cuenta cuando se considera el concepto de sostenibilidad.

Las harinas derivadas de microalgas pueden ser una alternativa potencial a la harina de pescado (Nandeesha *et al*. 2001), ya que poseen un alto contenido proteico, son la fuente de alimento natural de numerosas especies marinas, contienen niveles altos de ácidos grasos poliinsaturados, aminoácidos, vitaminas y minerales, y son una excelente fuente de pigmentos naturales (Spolaore *et al*. 2006).

Las microalgas se requieren durante un breve período para la nutrición de larvas, ya sea para consumo directo, como en el caso de los moluscos y crustáceos o indirectamente como alimento para la presa viva con la que se alimentan las larvas de peces (Muller-Feuga, 2000). Los géneros más frecuentemente empleados son *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova, Phaeodactylum, Chaetoceros, Nannochloropsis, Skeletonema y Thalassiosira* (Yamaguchi, 1997; Borowitzka, 1997; Muller-Feuga, 2000). Pero además, la biomasa de las microalgas también pueden ser cosechada, secada e incorporada en las dietas para peces juveniles y adultos (Benemann, 1992). Adicionalmente, y en el marco de la política general de mejora de la sostenibilidad y calidad de los productos de acuicultura, las microalgas

tienen un enorme potencial en la sustitución de algunos de los componentes de los piensos de engorde de peces.

Hasta la fecha existen numerosos estudios en los que se incluyen microalgas en alimentos para peces. Los diversas investigaciones que se han realizado para evaluar el efecto de la inclusión de las algas en piensos inertes para diferentes especies, tales como la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) o dorada (*Sparus aurata*) destacan como efectos positivos el incremento significativo de las tasas de crecimiento y utilización del alimento (El Sayed, 1994; Mustafa *et al.* 1994; Mustafa & Nakagawa, 1995), las mejoras en la asimilación de proteínas (Nakagawa *et al.* 1997), el efecto positivo sobre el metabolismo lipídico (Nakagawa *et al.* 1987; Robin & Vincent, 2003), la mejora en la coloración de los animales, el incremento en la función hepática (Nematipour *et al.*, 1987; Nakagawa *et al.* 1995), la mejora en la respuesta al estrés (Nakagawa *et al.* 1997), y el incremento en la resistencia a enfermedades (Satoh *et al.* 1987). En la actualidad, a las ventajas nutritivas que tienen, se les une la mejora en la tecnología para su producción a gran escala si se cultivan en los biorreactores apropiados, y el incremento en su contenido proteico, hechos que hacen de esta materia prima un ingrediente novedoso, que recibe una creciente atención en la formulación de piensos para peces (Lahaye *et al.* 1995; Pinchetti *et al.* 1998). Además de su valor nutricional, en los últimos años se ha generado un gran interés por el uso de la biomasa de microalgas por sus beneficios económicos al poderlas utilizar con distintos propósitos (Pulz & Gross, 2004). De este modo, un cultivo de microalgas puede ser utilizado para la depuración de efluentes, y el contenido lipídico de la biomasa obtenida emplearse en la producción de biocombustibles y, finalmente, la materia resultante tras la extracción de los aceites, destinarse a la alimentación animal (Olguín *et al*. 2012).

En este contexto, en la Universidad de Almería y en el marco del proyecto P09-AGR-5334, se estudian diferentes microalgas con el objetivo de desarrollar la tecnología para su producción masiva con el fin último de emplearlas en alimentación de peces de acuicultura. Una de las microalgas estudiada es *Scenedesmus almeriensis*. La microalga *S. almeriensis* es una especie nueva que fue aislada por investigadores de la Universidad de Almería y de

la Estación Experimental "Las Palmerillas" de la Fundación CAJAMAR (Almería), siendo protegida mediante patente europea EP-1849858-B1, e identificada como "microorganismo no previamente registrado" por la Experimental Phycology and Culture Collection of Algae—SAG de la Universidad de Gottinghem (Sánchez-Fernández, 2008). Las ventajas que tiene esta microalga frente a otras microalgas es que es tolerante a un amplio rango de temperaturas (10 a 40ºC), presentando óptimos de crecimiento a temperaturas a las que las otras especies no crecen (30ºC), y que se cultiva en agua dulce, y por lo tanto no es necesario lavar la biomasa para retirar las sales marinas. Además, la materia seca resultante tras la producción del biocombustible, sigue teniendo un alto valor nutricional, debido a su alto contenido en proteínas (hasta un 40%). De esta forma, *S. almeriensis* se convierte en una muy buena candidata como ingrediente alternativo a la harina de pescado, por su bajo coste de producción al poder ser cultivada en diversos efluentes, y por el doble uso que se le puede dar a su biomasa, energético y alimenticio, lo que incrementa su rentabilidad.

Como se ha indicado anteriormente, las referencias bibliográficas en las que se realizan estudios zootécnicos para evaluar el crecimiento de los peces cuando éstos son alimentados con piensos que incluyen microalgas son abundantes, pero a día de hoy no son tan numerosos los estudios que analizan los efectos que produce la utilización de estos ingredientes sobre la fisiología del pez desde un enfoque holístico, y en el caso particular de los juveniles de dorada (*Sparus aurata*, L.), una especie de gran interés en la acuicultura europea, no se tiene conocimiento de que se haya publicado alguno. Es por ello que resulta de particular relevancia analizar qué otros efectos se producen con la utilización de esta microalga en el alimento. Precisamente uno de los aspectos que está relacionado con la alimentación del animal a considerar es el estudio de los procesos que están implicados en la digestión y absorción del alimento.

En base a lo anteriormente expuesto, el objetivo general del presente estudio es realizar una evaluación global del potencial de la microalga *Scenedesmus almeriensis* para ser utilizada como fuente proteica alternativa a la harina de pescado en la alimentación de juveniles de dorada, *S. aurata*. Este objetivo general se desglosa en los siguiente objetivos parciales que son; 1) evaluar el crecimiento de juveniles de *S. aurata* alimentados con dietas en las que la

harina de pescado se sustituye parcialmente por harina de la microalga *S. almeriensis*, 2) cuantificar el aprovechamiento nutritivo de dichas dietas, 3) analizar su influencia en la composición química, de ácidos grasos de los peces, y en la estructura y funcionalidad del intestino, y 4) realizar una valoración económica del uso de *S. almeriensis* en alimentos para acuicultura de peces marinos carnívoros.

Material y Métodos

Animales e instalaciones

El bioensayo se realizó en el acuario del campo de prácticas de la Escuela Superior de Ingeniería de la Universidad de Almería. En los ensayos se emplearon juveniles de dorada (*Sparus aurata*) procedentes de la empresa Predomar S.L. (Carboneras, Almería, España). Durante la aclimatación a las condiciones del acuario de la Universidad de Almería, las doradas fueron alimentadas con una dieta comercial (Skretting) hasta alcanzar un peso de aproximadamente 8 gramos. A partir de este momento se realizó la selección, y los peces fueron distribuidos aleatoriamente en los tanques experimentales. Se repartieron 225 individuos en 15 tanques a razón de 15 peces por tanque. El sistema utilizado consta de 15 tanques de polipropileno de color gris oscuro, fondo plano y con capacidad de 40L. Los ensayos se realizaron en un circuito cerrado, que constaba de dos tanques de reserva, un filtro físico para la retención de residuos sólidos, un filtro biológico para la eliminación de amonio y una lámpara ultravioleta para evitar la proliferación de microorganismos. La salinidad osciló del 23 al 28‰ y la temperatura osciló de 17 a 19ºC, y con fotoperiodo natural. La duración del experimento se prolongó hasta que los peces triplicaron su peso inicial. Los tratamientos se ensayaron por triplicado, los piensos se suministraron a una razón del 3 al 4% de la biomasa total del tanque al día. El alimento fue suministrado en dos tomas diarias a las 9:00 y a las 13:00 horas. Los tanques se sifonaban antes de cada toma, además cada día se anotaba la temperatura y salinidad antes de cada toma. Tras la primera toma se medía también el amonio por colorimetría con un kit de análisis rápido de agua, cuando su concentración superaba los 0,4 mg L^{-1} se procedía a renovar el agua del sistema. Cada 15 días los peces se anestesiaban suavemente en un baño de aceite de clavo (25ppm)

y se pesaban, para recalcular la dosis diaria de pienso, devolviéndolos posteriormente a sus respectivos tanques.

Biomasa algal

La biomasa se produjo a escala industrial en condiciones externas con fotobiorreactor tubular de 3000L, en modo continuo a una tasa de dilución de 0,4L día^{-1}, en el mes de marzo de 2011. Los cultivos se realizaron a pH 8,0 con inyección de CO_2 a demanda, y la temperatura fue mantenida a 30ºC con un termostato, haciendo pasar el agua por un intercambiador de calor localizado en el interior del fotobiorreactor. Posteriormente la biomasa se recogió por centrifugación y fue sometida a una serie de procesos para obtener un preparado seco (Cerón *et al*. 2008). Brevemente, para la obtención de harina de *S. almeriensis*, el cultivo de las microalgas previamente cosechadas por centrifugación, fue congelado a -18ºC para su posterior liofilización. Una vez liofilizada la biomasa de *S. almeriensis*, fue molida en un molino de bolas y pasada por un tamiz de 300µm, una vez tamizada la harina quedó lista para su posterior inclusión en los piensos experimentales.

Piensos experimentales: diseño y elaboración

Se elaboraron 5 piensos experimentales en los que se sustituyó parcialmente la proteína de la harina de pescado por harina de la microalga *Scenedesmus almeriensis*. Así la proteína de la harina de pescado se fue sustituyendo en niveles de un 25% (SC25); 37,5% (SC37); 50% (SC50) y un 75% (SC75), siendo un total de 4 piensos experimentales más uno que se utilizó como control que no contenía harina de *S. almeriensis* (CT). En todos los casos se incluyó una proporción fija de harina de calamar (un 5%) que actuase como atrayente para los peces. También se incluyó en la formulación, un enriquecedor de lípidos que aportase ácidos grasos poliinsaturados, un concentrado de proteína de soja, lecitina de soja (como fuente extra de fosfolípidos), y una premezcla de vitaminas y minerales (con 20% de vitamina C), con el fin de que los piensos formulados fuesen lo más completos posible, evitando déficit en aminoácidos o ácidos grasos esenciales. Todos los piensos fueron formulados para ser isoproteicos e isoenergéticos.

Para la fabricación de los piensos, los ingredientes sólidos fueron mezclados durante 20min en una amasadora Sammic BM-11 (Sammic S.L. Azpeitia, España), posteriormente se añadieron los ingredientes líquidos y el cloruro de colina que fue disuelto en agua destilada (500mL aproximadamente). La mezcla resultante fue amasada de nuevo durante un periodo adicional de 15min. Una vez obtenida la masa, se procedió a su granulación mediante una picadora de carne Braher P22-82 (Braher Internacional SA. Andoain, España), obteniendo gránulos de 1 a 2mm de diámetro y de 2 a 4mm de longitud aproximadamente. El secado de los piensos se realizó en el laboratorio de producción animal garantizando que fuera un lugar fresco y seco, el secado se completó en 24 horas, y una vez elaborados, éstos fueron almacenados a –20ºC hasta su uso. La Tabla 1 detalla los ingredientes utilizados en la elaboración de los piensos experimentales así como su composición química.

Tabla 1**.** Composición de los piensos experimentales utilizados en el ensayo con dorada.

Ingredientes (%MS)	Control	SC25	SC37	SC50	SC75
Harina de pescado LT[1]	51,6	43,5	39,5	35,5	27,4
Biomasa de *S. almeriensis*	0,0	12,9	19,4	25,8	38,7
Harina de calamar[3]	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hidrolizado de pescado CPSP90[5]	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Concentrado de soja[4]	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Aceite de pescado[1]	2,2	2,0	1,8	1,7	1,4
Enriquecedor de lípidos[6]	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Lecitina de soja[1]	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Dextrina	24,1	19,5	17,2	14,9	10,4
Carboximetilcelulosa[2]	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Cloruro de colina[2]	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Premix de vitaminas y minerales[1]	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Goma guar	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Alginato[2]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Composición química (%MS)					
Proteína bruta	47,1	47,7	47,8	47,0	46,6
Grasa bruta	8,4	11,0	10,6	9,6	8,3
Cenizas brutas	14,2	14,7	16,5	16,7	18,8
Fibra bruta	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3

1 Proveedor local (Almería, España). 2 Sigma (España). 3 Rieber&Son (Noruega). 4 DSM (Francia). 5 Concentrado proteico soluble de pescado, Sopropêche (Francia). 6 INVE (Bélgica).

Toma de muestras biológicas

En la toma de muestras correspondiente al inicio del experimento, se tomaron 15 individuos al azar antes de distribuir a las doradas en sus correspondientes unidades experimentales, se anestesiaron en un baño de aceite de clavo (2ppm), y a continuación se sacrificaron mediante una incisión en la columna vertebral a la altura de los opérculos (Directiva Comunitaria 2010/63/UE). Se midió la longitud de cada uno de los individuos mediante un ictiómetro, posteriormente se pesaron en una balanza de precisión, a continuación se extrajeron las vísceras y se anotó el peso del intestino, el hígado y la carcasa. Tanto los hígados como las carcasas se congelaron a -20ºC y se liofilizaron, para, posteriormente, volver a utilizarse en posteriores análisis. En la toma de muestras correspondiente al final del experimento, se sacrificaron todos los individuos, mediante el mismo procedimiento que en la toma de muestras correspondiente al inicio. A continuación se anotaron las longitudes de los peces y los pesos frescos, de las canales, hígados e intestinos, al igual que en el muestreo inicial. También se prepararon 5 muestras de intestino distal, intestino proximal e hígado de cada unidad experimental; para su análisis histológico, posteriormente tanto los hígados, como las carcasas, fueron congeladas a -20ºC, liofilizadas y congeladas de nuevo al igual que en el muestreo inicial. Por otra parte se utilizaron muestras de intestino para la preparación de extractos enzimáticos, y de otro, muestras de 0,5 cm de longitud del intestino proximal para su análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM).

Determinación de los parámetros zootécnicos y morfométricos

A partir de los datos obtenidos en el apartado anterior se calcularon los siguientes parámetros zootécnicos y morfométricos: Incremento de peso (WG) = (Pf/Pi) × 100; Tasa de crecimiento específico (SGR) (%) = (Ln (P_f) – Ln (P_i) / días) x 100, donde P_f y P_i son el peso fresco final e inicial y t es la duración del ensayo en días; Tasa de crecimiento absoluto (AGD) (g día^{-1}) = (P_f – P_i) / días; Factor de condición (K) = (P_f / longitud final ^{3}) x 100; Índice viscerosomático (IV) (%) = (peso seco del digestivo / peso seco del individuo)

x 100; Índice hepatosomático (IH) (%) = (peso seco del hígado / peso seco del individuo) x 100; Índice de conversión = g de pienso suministrados / incremento de biomasa.

Determinación de la composición proximal

Para la determinación de la composición proximal se homogeneizaron la totalidad de las carcasas previamente liofilizadas y una muestra de cada uno de los piensos utilizados. La composición proximal de los piensos y de las muestras de tejidos se determinó analizando su contenido en agua, proteína cruda, lípidos totales, cenizas y por diferencia se estimó el contenido de carbohidratos. La humedad de los peces fue determinada por gravimetría, una vez pesadas las muestras frescas y liofilizadas (Cryodos, Ima-Telstar. Tarrasa, España). La proteína cruda mediante un analizador elemental Fisons Carlo Erba EA 1108 (Fisons Instruments, Beverly, MA, USA), multiplicando el contenido de nitrógeno de la misma por 6,25. Las cenizas fueron determinadas por gravimetría tras incineración de 1g del filete liofilizado en un horno mufla a 550ºC durante 24h según el método estándar (AOAC, 1995). El contenido de lípidos totales fue cuantificado mediante la metodología descrita por Christie (1982). Brevemente, los lípidos fueron extraídos con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) con 0,01% de hidroxitoluenobutilado (BHT) como antioxidante. Seguidamente el solvente orgánico fue evaporado con nitrógeno, y el contenido lipídico se determinó por gravimetría.

Determinación del perfil de ácidos grasos

Para la extracción de ácidos grasos se usaron muestras de músculo e hígado de la totalidad de las doradas, previamente liofilizadas, junto con las muestras de cada uno de los piensos experimentales, utilizando el protocolo diseñado por Rodríguez *et al*. (1998). La determinación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos contenidos en la biomasa se realizó a partir de sus ésteres metilados mediante cromatografía de gases. Se empleó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard, modelo 4890 Series II (Hewlett Packard Company, Avondale, PA). En esencia el cromatógrafo de gases determina ésteres metilados, por lo tanto los ácidos grasos son metilados. Se ha utilizado una modificación

del método de transesterificación directa y descrito por Lepage y Roy (1984) que no necesita separación previa de la fracción lipídica y que permite un ahorro de tiempo y reactivos (Rodríguez *et al*. 1998). En primer lugar, se homogeneizó la muestra a analizar con mortero. Posteriormente se pesó una cantidad determinada de la muestra y se añadió la misma cantidad de alúmina y se molturó durante 5min con fuerza. De ahí se cogió una porción de unos 10mg de biomasa y se depositaron en un tubo de rosca pirex con tapón con almohadilla. Seguidamente se adicionó 1mL de mezcla metilante (20:1 v/v metanol / cloruro de acetilo). Se añadieron 5µL de patrón (25mg de patrón C:19 en 1mL de tolueno) y 0,5mL de hexano. La metilación se realizó a 100ºC en el termobloc durante 20min, evitando la evaporación del hexano. Pasados los 10min se dejó que la mezcla alcanzase la temperatura ambiente. Se le añadió 1mL de agua destilada para diferenciar bien las fases, y se extrajo la capa hexánica, que se introdujo en un vial, se cerró, y se inyectó en el cromatógrafo de gases. El análisis cuantitativo se realizó utilizando como patrón interno ácido nonadecanoico (19:0). Cada muestra contenía 5µL de disolución de patrón interno (0,125mg de 19:0). El detector FID presenta la misma respuesta o sensibilidad para cada uno de los ácidos grasos, por tanto el factor de corrección para los solutos y para el patrón interno es el mismo, siendo su valor la unidad. Para el estudio de los ácidos grasos se calcularon los sumatorios de los ácidos grasos saturados (∑SFA), monoinsaturados o monoenos (∑MUFA), poliinsaturados (∑PUFA), por otra parte, también fueron clasificados como n-3 (∑n-3), n-3 altamente insaturados (∑n-3 HUFA), n-6 (∑n-6) y n-9 (∑n-9). Además se obtuvieron ciertos ratios de interés entre dichos sumatorios (n-3/n-6; MUFA/ n-3 HUFA, MUFA/PUFA, MUFA/SFA) y entre ácidos grasos que relacionan el ácido docosahexanoico (DHA o 22:6n3), ácido eicosapentanoico (20:5n3 o EPA) y ácido araquidónico (20:4n6 o AA).

Preparación de los extractos enzimáticos digestivos

Los tejidos de tres peces se agruparon al azar por cada extracto enzimático obteniendo cuatro extractos por cada tanque experimental. Los intestinos se homogenizaron en agua destilada y el homogenado fue sonicado en frío (4°C) mediante tres pulsos cortos de 10 segundos. Seguidamente se centrifugó (12.000rpm, 12min, 4°C), y el sobrenadante se repartió en alícuotas para su conservación a -20°C hasta su posterior uso. A estos extractos se les determinó la concentración de proteína soluble, usando seroalbúmina bovina (1mg mL^{-1}) como estándar (Bradford, 1976).

Determinación de las actividades enzimáticas digestivas

Las actividades proteasa alcalina, tripsina, quimotripsina y amilasa se cuantificaron como indicadores de la capacidad digestiva, mientras que las actividades leucina-aminopeptidasa y fosfatasa alcalina se analizaron como indicadores de la absorción a través del epitelio. Brevemente, la actividad proteasa alcalina se determinó empleando una modificación del método de Kunitz (1947), modificado por Walter (1984) usando como sustrato caseína tamponada en Tris-HCl 100mM a pH 9. La mezcla de reacción (extracto enzimático más caseína tamponada) se incubó durante 20min a 37°C, y la reacción enzimática se detuvo con ácido tricloroacetico (TCA) al 20%. La liberación de péptidos se cuantificó determinando la absorbancia del sobrenadante a 280nm. La actividad específica (U mL^{-1}) se calculó utilizando como coeficiente de extinción molar de la tirosina (CEM) el valor de 0,008. El resto de actividades se cuantificó mediante cinética midiéndose el incremento de absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 405nm utilizando sustratos específicos para cada una de ellas. Así, se usó BAPNA (N-benzoil-DL-arginina-P-nitroanilida) 0,5mM para la cuantificación de la actividad tripsina, SAPNA (succinil-$(Ala)_2$-Pro-Phe-P-nitroanilida) 0,2mM para la actividad quimotripsina, para la actividad amilasa se usó un sustrato comercial Amylase MR (ref. KR10065,Clonatest, Barcelona, España), para las actividades leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina, L-leucina p-nitroanilida (LpNa) 2mM y p-nitrofenilfosfato 450mM, respectivamente. La actividad específica (U mL^{-1}) se calculó utilizando un valor de CEM de la P-nitroanilida de 8.800

para tripsina, quimotripsina y L-aminopeptidasa y un CEM para el P-nitrofenol de 17.800 para las actividades amilasa y fosfatasa alcalina. Finalmente, todos los valores de actividad obtenidos se expresaron en U g de tejido^{-1}.

Visualización de la actividad proteasa mediante electroforesis

La electroforesis se realizó según el método descrito por Laemmli (1970), empleando geles de poliacrilamida al 12% y con un tamaño de 8x10x0, 075cm. Las muestras enzimáticas se diluyeron (1:1, v/v) con tampón de muestra (Tris-HCl 0,125mM pH 6,8, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,04% y SDS 2%). La electroforesis se desarrolló a un voltaje continuo de 100V por gel durante una hora a 4ºC. Seguidamente, los geles fueron tratados según se describe en Alarcón *et al*. (1998) con el fin de revelar la actividad proteasa presente en de los extractos. En breve, éstos se lavaron con agua destilada, se les añadió una solución de caseína 0,75% preparada en Tampón Tris-HCl 50mM a pH 9, y se incubaron durante 30min a 4ºC, después fueron transferidos a una solución fresca del mismo sustrato durante 90min a 37ºC. Después de esto, se retiró la solución de caseína, se lavaron los geles varias veces con agua destilada y se fijaron con ácido tricloroacético (TCA) al 12% durante 10min antes de proceder a su tinción con azul brillante (Coomassie Brilliant Blue R-250) en una solución con metanol y ácido acético glacial durante 12h. Para desteñir los geles se empleó la misma solución pero sin colorante. A los pocos minutos pudo apreciarse una serie de bandas blancas sobre un fondo azul que se corresponden con las fracciones activas con actividad caseinolítica presente en los extractos enzimáticos.

Evaluación de factores anti nutritivos en los piensos experimentales

El objetivo fue analizar la presencia de inhibidores de proteasas tanto de la harina de microalga como de cada uno de los cinco piensos empleados en el bioensayo. Para ello, se realizaron extractos acuosos de las harinas algales y los piensos con el propósito de extraer los potenciales inhibidores contenidos en ellos. En breve, 1g de materia se suspendió en 10mL de agua destilada. El conjunto se sonicó en frío durante tres pulsos de 12 segundos. La mezcla resultante se almacenó a 4ºC durante 12h, y seguidamente se centrifugó a

12.000rpm durante 15min a 4ºC, recuperándose la fracción del sobrenadante (en el que se encuentran los potenciales inhibidores de proteasa) que finalmente fue almacenada a -20ºC hasta su uso.

Para analizar la presencia de inhibidores de proteasa, un extracto enzimático de referencia (preparado a partir de tejidos de peces alimentados con pienso control) se preincubó con los extractos acuosos de la harina algal y los piensos. Durante esta fase se pretende que los potenciales inhibidores se acomplejen con las proteasas digestivas para impedir posteriormente que ejerzan su actividad catalítica. De este modo, 10µL de extracto enzimático se preincubaron durante una hora a temperatura ambiente con 10µL del extracto con potencial efecto inhibidor en 500µL de tampón Tris-HCl 100 mM a pH 9. Se incluyó un control enzimático en el que en lugar de la solución con potencial efecto inhibidor se dispensaron 10µL de agua destilada. Finalizado este tiempo, se realizó un ensayo de actividad proteasa alcalina con caseína como sustrato siguiendo a partir de este punto el mismo protocolo expuesto anteriormente. Cada ensayo se realizó por triplicado y con su correspondiente blanco. Los valores obtenidos fueron expresados en porcentaje de actividad residual, utilizando como referencia los valores de absorbancia del ensayo control cuya preincubación se realizó con agua destilada en lugar de con extracto acuoso de alga o pienso.

Análisis histológico de los tejidos hepático e intestinal

Las muestras de tejidos (hígado e intestino) fueron fijadas en solución Davidson, incluidas en parafina, y cortadas en un microtomo (6µm). Una vez que fueron desparafinadas se tiñeron con hematoxilina-eosina para la observación histomorfológica de los tejidos. Las fotografías de las secciones se realizaron con un microscopio invertido OLYMPUS IX51 equipado con el software cell^B versión 2.6 (Olympus Soft Imaging Solutions GmdH. Muenster, Alemania). Se analizó la morfometría del tejido hepático e intestinal de los peces a partir de las imágenes de los tejidos obtenidas al microscopio óptico. En concreto se determinó el área y la longitud del diámetro mayor de los hepatocitos, y la altura de las vellosidades y de los enterocitos en las preparaciones de intestino, empleando el programa

de software libre UTHSCA ImageTool (Universidad de Texas HealthScience Center, San Antonio, TX, disponible en el enlace http://ddsdx.uthscsa.edu). Los resultados se expresaron como medias y desviación estándar de al menos 32 determinaciones realizadas sobre 20 preparaciones histológicas de hígado y de 9 determinaciones realizadas sobre 25 preparaciones histológicas tanto de intestino distal como proximal, a razón de 5 por tratamiento.

Análisis ultraestructural y morfométrico de la mucosa intestinal

Para el análisis mediante microscopía electrónica (TEM y SEM) las secciones de intestino proximal se fijaron en una solución de glutaraldehido al 2,5% y formaldehido al 2%, preparada en tampón PBS pH 7,5. Las muestras destinadas a su observación por SEM en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Almería se sometieron a sucesivos lavados con etanol a distintas concentraciones (desde etanol al 10% a etanol absoluto) para su deshidratación progresiva. A continuación se realizó una desecación de las muestras en la que se sustituyó el etanol absoluto por CO_2 líquido empleando un equipo Critical Point CPD 030, seguidamente se eliminó el CO_2 líquido y se pasaron las muestras a un desecador. Las muestras desecadas se montaron en los correspondientes soportes, se fijaron con grafito (PELCO® Colloidal Graphite). Una vez fijadas y montadas, éstas se metalizaron empleando la técnica de recubrimiento mediante pulverización catódica o *método Sputtering*, para lo cual se utilizó un equipo Sputter Coater SCD 005. Por último se visualizaron las muestras ya procesadas empleando un microscopio electrónico de scaning (SEM) HITACHI modelo S-3500. Por otro lado, las muestras destinadas a su observación mediante TEM se lavaron tres veces con PBS durante 20min y fueron enviadas al Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (España) para su inclusión en resina y obtención de cortes ultrafinos. A partir de ambos tipos de muestras se obtuvo una galería de imágenes (al menos 10 imágenes TEM y 10 SEM por tratamiento) para su posterior análisis morfométrico. Las imágenes obtenidas mediante SEM y TEM fueron utilizadas para evaluar el estado de la mucosa intestinal de los juveniles de dorada mediante el análisis morfométrico de las mismas. Para realizar este estudio se empleó un programa

de software libre UTHSCA ImageTool. En concreto se realizaron las siguientes mediciones.

i) Imágenes TEM: se obtuvo información sobre la altura y el diámetro de las microvellosidades. se realizaron al menos 100 medidas por tratamiento. Teniendo en cuenta que la morfología de las microvellosidades se aproxima a la de un cilindro, los datos anteriores se utilizaron para estimar la superficie de absorción por enterocito empleando la siguiente fórmula $(2 * \pi * r * h) + \pi * r^2$ siendo *r* y *h* la mitad del diámetro y altura de los microvilli, respectivamente.

ii) Imágenes SEM: en este caso se cuantificó el área apical por entericito, y se realizaron al menos 50 mediciones por tratamiento.

El análisis ultraestructural permite estimar la superficie media de absorción por enterocito en función del tratamiento que han recibido los peces, así como analizar cuál es el efecto que produce el uso de la microalga sobre la integridad física de la mucosa intestinal de los peces. De igual modo, también se establece si existe o no relación entre estos datos y los niveles de actividad de las enzimas asociadas a las microvellosidades intestinales (aminopeptidasa y fosfatasa alcalina).

Evaluación económica del uso de la biomasa algal en dietas para peces.

Se realizó una valoración económica considerado dos precios hipotéticos de la biomasa algal, i) por un lado un valor de 7 € kg^{-1} que ha sido propuesto para la biomasa de la especie *Phaeodactylum tricornutum* que es una microalga cuya composición bioquímica es muy similar a *S. almeriensis* (Belarbi *et al*. 2000) y, ii) de otro 12,6 € kg^{-1} que es el precio de producción propuesto por Acién *et al*. (2012) en la Planta Experimental de "Las Palmerillas". Desde otra perspectiva, se realizó un análisis de coste-beneficio considerando, por un lado el precio del pienso calculado con las dos opciones anteriores (criterio económico), y de otro el balance FIFO (Fish In–Fish Out) resultante de sustituir la harina de pescado por *S. almeriensis* (criterio ambiental). Con este planteamiento, de los puntos de corte entre ambas curvas se podrían obtener valores hipotéticos de inclusión del alga en los que el precio del pienso estaría justificado por una menor presión sobre las pesquerías.

Análisis estadístico

Los valores presentados en las tablas corresponden a la media ± desviación estándar (sd) de al menos tres determinaciones. En las figuras se representa la media ± error estándar de la media (sem). Los datos en porcentajes fueron normalizados mediante la raíz del arco seno de la observación de forma previa al análisis estadístico, que se realizó con el paquete estadístico Statgraphics Plus 4.0 para Windows (Rockville, Maryland, USA). En todos los casos se comprobó la normalidad y homogeneidad de la varianza. En el caso en que los datos no cumplieran una de esas dos premisas se procedió a transformarlos mediante el logaritmo neperiano o la raíz cuadrada de la variable, en función del menor valor del número de Barletts. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de una vía en los datos con distribución paramétrica o Kruskall-Wallis en aquellas variables con distribución no paramétrica. En el caso de que las variables presentaran diferencias significativas entre los valores medios de los distintos tratamientos, estos últimos fueron analizados mediante test de comparación múltiple; i) test de Tukey para los datos paramétricos, o ii) mediante una gráfica de cajas y barras (*Box and Whisker Plot*) para los no paramétricos. En los casos en que se compararon dos tratamientos se utilizó una comparación de medias (t-student). Todos los análisis fueron realizados con un nivel de significación de 0,05.

Por último se utilizaron análisis multivariante clúster (método del vecino más alejado con los datos estandarizados). Los distintos parámetros fueron considerados como variables diferentes, y por lo tanto el efecto de cada fórmula alimenticia fue analizado por número elevado de variables. Los datos fueron estandarizados antes del análisis con el propósito de que tuviesen la misma relevancia, independiente de cómo fueran las diferencias de magnitud entre las distintas variables. Este tipo de análisis determina la similitud entre los distintos tratamientos al proporcionar dendrograma en el que se agrupan éstos en función de la distancia que hay entre ellos.

Resultados

Crecimiento y aprovechamiento nutritivo de los piensos

En general, los peces del tratamiento SC37 mostraron valores medios mayores en la mayoría de los índices zootécnicos que el del resto de tratamientos, a excepción de los registrados en los parámetros IVS y el IHS, en los que el tratamiento control (CT) presentó valores más altos (Tabla 2). Cuando los piensos incluyeron niveles de sustitución superiores al 50% se observó una reducción significativa en el peso final, y en los valores de ADG, WG, IVS e IHS. De los peces alimentados con microalgas, los del tratamiento SC25 mostraron valores más bajos en todos los parámetros zootécnicos, a excepción de los registrados para IHS que fueron ligeramente mayores que en los peces alimentados con SC75. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ni en la longitud final ni en el factor de conversión, si bien en SC37 se encontraron valores medios más altos en ambos parámetros. El valor del balance FIFO (del inglés, Fish In - Fish Out ratio) mostró un descenso gradual conforme se aumentó el contenido de biomasa de *S. almeriensis*.

Tabla 2. Crecimiento, índices de aprovechamiento nutritivo e índices morfométricos de los ejemplares juveniles de *S. aurata* alimentados con piensos experimentales que incluyen distintos niveles de biomasa de *S. almeriensis*.

	Control	SC25	SC37	SC50	SC75
P_i (g)[1]	8,23 ± 1,53	8,37 ± 1,45	8,29 ± 1,48	8,21 ± 1,28	8,15 ± 1,40
P_f (g)[2]	25,01 ± 3,83 ^{ab}	23,37 ± 3,57 ^{a}	26,56 ± 3,50 ^{b}	24,96 ± 2,85 ^{ab}	24,13 ± 4,43 ^{a}
L_f (cm)[3]	9,81 ± 0,43	9,66 ± 0,52	9,97 ± 0,42	9,91 ± 0,43	9,79 ± 0,56
SGR[4]	1,46 ± 0,07 ^{ab}	1,30 ± 0,04 ^{a}	1,57 ± 0,08 ^{b}	1,46 ± 0,05 ^{ab}	1,40 ± 0,08 ^{ab}
ADG[5]	0,18 ± 0,01 ^{ab}	0,16 ± 0,01 ^{a}	0,20 ± 0,01 ^{b}	0,18 ± 0,01 ^{ab}	0,10 ± 0,01 ^{a}
IC[6]	1,92 ± 0,22 ^{ab}	2,11 ± 0,06 ^{b}	1,70 ± 0,03 ^{a}	1,86 ± 0,14 ^{ab}	1,91 ± 0,18 ^{ab}
PER[7]	0,95 ± 0,10 ^{ab}	0,86 ± 0,03 ^{a}	1,07 ± 0,02 ^{b}	0,98 ± 0,07 ^{b}	0,96 ± 0,10 ^{ab}
WG (%)[8]	303,9 ± 6,9 ^{ab}	279,2 ± 3,6 ^{a}	320,4 ± 8,3 ^{b}	304,0 ± 4,6 ^{ab}	296,1 ± 7,8 ^{a}
IVS[9]	8,04 ± 0,92 ^{b}	7,31 ± 1,05 ^{ab}	7,99 ± 1,25 ^{b}	7,47 ± 1,01 ^{b}	7,32 ± 1,07 ^{a}
IHS[10]	2,30 ± 0,38 ^{b}	2,09 ± 0,44 ^{b}	2,23 ± 0,45 ^{b}	2,06 ± 0,36 ^{b}	1,82 ± 0,39 ^{a}
FIFO[11]	3,65 ± 0,23 ^{c}	3,49 ± 0,11 ^{b}	2,56 ± 0,04 ^{b}	2,44 ± 0,06 ^{c}	2,00 ± 0,19 ^{a}

Los valores representan la media ± sd (n = 45). Dentro de cada fila las diferencias significativas entre tratamientos para un mismo parámetro se indican con distintos superíndices ($P < 0,05$). [1] Peso inicial en g; [2] Peso final en g; [3] Longitud final en cm; [4] Tasa de crecimiento específico (% día^{-1}): SGR = 100 × (ln P_f – ln P_i) / t; [5] Peso medio diario ganado (g día^{-1}): ADG = ΔP / t, donde el ΔP es el incremento de peso; [6] Índice de conversión, IC = alimento seco ingerido / ΔP; [7] Tasa de eficiencia de la proteína, PER = ΔP / g proteína ingerida; [8] Ganancia de peso (%), WG = (P_f / P_i) × 100; [9] Índice viscerosomático (%), IVS = ($P_{visceral}$ / P_f) × 100; [10] Índice hepatosomático (%), IHS = ($P_{hígado}$ / P_f) × 100; [11] FIFO = (% de harina de pescado en pienso + % de aceite de pecado en pienso) / (% rendimiento de extracción de harina de pescado en peces pelágicos + % rendimiento de extracción de aceite de pescado en peces pelágicos) × IC.

Composición química de los peces

La inclusión de biomasa liofilizada de *S. almeriensis* no modifica la composición química de las doradas de manera significativa (Tabla 3). Sin embargo, los valores mayores de proteína se encontraron en los individuos alimentados con la dieta SC37, aunque sin presentar diferencias significativas respecto al resto de tratamientos. En cuanto al contenido lipídico de las carcasas, tampoco se evidenciaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales, si bien con la dieta SC25 los peces presentaron los valores más altos.

Tabla 3. Composición proximal (% peso seco) de las carcasas de los ejemplares juveniles de *S. aurata*. Los valores representan la media ± sd (n = 3).

Tratamiento	Proteínas totales	Lípidos totales	Cenizas
Control	73,67 ± 4,15	17,2 ± 4,47	8,93 ± 0,23
SC25	72,82 ± 3,64	17,74 ± 4,16	9,09 ± 0,43
SC37	74,96 ± 1,11	15,52 ± 1,28	9,37 ± 0,49
SC50	72,94 ± 5,22	17,60 ± 5,90	9,11 ± 0,68
SC75	74,42 ± 5,39	15,90 ± 5,84	9,36 ± 0,50

Perfil de ácidos grasos en los tejidos de los peces

La Tabla 4 muestra el perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica de cada uno de los piensos experimentales. Los resultados indican que los piensos elaborados con harina algal presentan un mayor contenido en ácidos grasos de las series n-3 y n-6 que el control (CT). Por el contrario los niveles de HUFAs y n-3 HUFAs fueron menores en los piensos con *S. almeriensis*. Así el pienso con mayor contenido en DHA es el control, apreciándose una

reducción en el contenido de este ácido graso en los piensos que contenían harina microalgal, fenómeno también se observado en el contenido de EPA. En cuanto a los ácidos grasos saturados no se dieron diferencias significativas, a excepción del pienso SC37 que presentó un contenido del 36%. El pienso control presentó el mayor contenido en monoenos (19,63%). Con respecto al ácido linoleico (18:2n-6), su contenido fue superior en los piensos elaborados con biomasa de *S. almeriensis*. Se encontró una correlación lineal entre el contenido de ciertos ácidos grasos y el nivel de inclusión de la harina algal, como es el caso de 14:00 ($y = –0,013x + 3,006$; $R^2 = 0,8993$, $P = 0,0140$) o de 18:3n-3 ($y = 0,022x + 0,880$; $R^2 = 0,9735$, $P = 0,0018$).

La Tabla 5 muestra el perfil de ácidos grasos en la fracción lipídica del tejido hepático de las doradas alimentadas con los piensos experimentales. Los resultados obtenidos evidencian que el contenido de ácidos grasos saturados en este tejido sigue un patrón similar al que contienen los distintos piensos. En cuanto al contenido de ácidos grasos poliinsaturados (HUFAs), se observó una reducción significativa en los peces alimentados con el pienso SC37. Los ácidos grasos de la serie n-9 se incrementaron significativamente en los hígados de los peces de los tratamientos SC37 y SC75. Los ácidos grasos de la serie n-6 alcanzaron su máximo contenido en el tejido hepático de los peces del grupo SC25, aunque no se encontraron diferencias significativas en la concentración de ácido araquidónico. Se apreció un notable descenso en el contenido de ácidos grasos n-3 en SC37, si bien en el resto de tratamientos no se encontraron diferencias significativas. Un fenómeno similar se evidenció para los ácidos grasos del grupo n-3 HUFAs. Los niveles de EPA experimentaron un descenso significativo en los peces alimentados con los piensos que incluyen harina de algas con respecto a los del tratamiento control. Por su parte, los niveles DHA solo se redujeron de forma significativa en los ejemplares de SC37. Las razones entre ácidos grasos mostraron diferencias significativas en los valores de AA/EPA, AA/DHA, MUFA/n-3 HUFAs y MUFA/SFA, para los que el mayor valor se obtuvo con los tratamientos SC75, SC37, SC37 y SC75, respectivamente.

El perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica del músculo se detalla en la Tabla 6. El estudio de los ácidos grasos reveló diferencias significativas entre tratamientos en el

contenido de HUFAs, observándose una ligera reducción, aunque significativa, de éstos en los peces alimentados con SC37 y SC75. Los mayores niveles de ácidos grasos pertenecientes a las series n-3 y n-6 se encontraron en el tejido muscular de los peces de SC50 y SC75, respectivamente. En cuanto al contenido de n-3 HUFAs, se encontró una reducción significativa de éstos en los tratamientos SC37 y SC75. El contenido de DHA en los peces alimentados con SC37 fue ligeramente menor que en el resto de tratamientos ($P <$ 0,05). El contenido de EPA fue significativamente inferior en todos los peces alimentados con piensos que incluían harina de *S. almeriensis.* No se observaron diferencias significativas en la composición en ácidos grasos saturados y monoinsaturados. En general, las razones entre ácidos grasos no mostraron diferencias significativas, a excepción de n-3/n-6 y de EPA/DHA que en ambos casos el mayor valor se encontró en los animales del tratamiento control.

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) del preparado microalgal y de los piensos experimentales.

Ácidos grasos	*S. almeriensis*	CT	SC25	SC37	SC50	SC75
14:00 mirístico	0,99	4,38 ± 0,14 ^{c}	3,75 ± 0,32 ^{b}	3,89 ± 0,08 ^{b}	3,56 ± 0,32 ^{b}	3,32 ± 0,08 ^{a}
16:00, palmítico	15,89	22,33 ± 0,25 ^{a}	20,81 ± 1,71 ^{a}	22,99 ± 0,33 ^{b}	22,71 ± 2,14 ^{b}	23,65 ± 0,35 ^{b}
16:1n7	0,78	5,28 ± 0,20 ^{b}	4,42 ± 0,41 ^{a}	4,57 ± 0,11 ^{a}	4,35 ± 0,50 ^{a}	4,36 ± 0,38 ^{a}
18:00, esteárico	0,35	5,58 ± 0,18 ^{d}	4,87 ± 0,46 ^{c}	5,16 ± 0,09 ^{cb}	4,83 ± 0,46 ^{b}	4,65 ± 0,05 ^{a}
18:1n9, oleico	5,19	12,65 ± 0,28	11,47 ± 0,89	12,47 ± 0,29	12,21 ± 1,17	12,47 ± 0,20
18:2n6, linoleico	6,32	11,43 ± 0,30 ^{a}	10,99 ± 1,00 ^{b}	12,64 ± 0,24 ^{c}	12,76 ± 1,35 ^{c}	13,99 ± 0,10 ^{d}
18:3n3, linolénico	27,90	2,43 ± 1,49 ^{a}	5,34 ± 0,40 ^{b}	8,21 ± 0,25 ^{c}	8,93 ± 1,05 ^{c}	11,58 ± 0,27 ^{d}
18:4n3	1,35	1,16 ± 0,05 ^{ab}	1,10 ± 0,14 ^{a}	1,28 ± 0,04 ^{b}	1,23 ± 0,15 ^{a}	1,26 ± 0,05 ^{b}
20:4n6, ARA	-	1,77 ± 0,13 ^{b}	1,58 ± 0,10 ^{a}	1,64 ± 0,09 ^{ab}	1,55 ± 0,20 ^{a}	1,53 ± 0,15 ^{a}
20:5n3, EPA	-	10,08 ± 0,39 ^{e}	8,48 ± 0,88 ^{d}	8,90 ± 0,11 ^{c}	8,12 ± 0,66 ^{b}	7,72 ± 0,10 ^{a}
20:1n9	-	1,70 ± 0,13 ^{c}	1,35 ± 0,16 ^{b}	1,41 ± 0,03 ^{ab}	1,40 ± 0,15 ^{a}	1,42 ± 0,05 ^{ab}
22:5n3	-	1,91 ± 0,17	1,56 ± 0,21	1,63 ± 0,19	1,48 ± 0,25	1,33 ± 0,17
22:6n3, DHA	-	16,45 ± 0,61 ^{e}	13,99 ± 1,52 ^{d}	14,75 ± 0,28 ^{c}	13,82 ± 1,34 ^{b}	13,06 ± 0,29 ^{a}
Saturados (SFA)	17,24	32,29 ± 0,39 ^{ab}	29,43 ± 2,48 ^{a}	36,01 ± 7,19 ^{b}	31,10 ± 2,90 ^{ab}	31,62 ± 0,40 ^{ab}
Monoenos (MUFA)	7,33	19,63 ± 0,52 ^{c}	17,23 ± 1,44 ^{ab}	18,45 ± 0,40 ^{a}	17,95 ± 1,72 ^{b}	18,24 ± 0,30 ^{a}
HUFA	-	29,90 ± 1,28 ^{e}	25,22 ± 3,00 ^{d}	26,31 ± 0,88 ^{c}	24,78 ± 2,19 ^{b}	23,31 ± 0,62 ^{a}
n-3	29,26	31,71 ± 1,02 ^{ab}	30,09 ± 3,46 ^{a}	34,16 ± 1,09 ^{b}	33,39 ± 3,12 ^{b}	34,62 ± 0,50 ^{b}
n-6	6,32	13,21 ± 0,35 ^{ab}	12,57 ± 1,02 ^{a}	14,28 ± 0,21 ^{b}	14,30 ± 1,32 ^{b}	15,52 ± 0,22 ^{c}
n-9	5,19	14,35 ± 0,38 ^{b}	12,81 ± 1,05 ^{a}	13,88 ± 0,29 ^{ab}	13,60 ± 1,31 ^{ab}	13,89 ± 0,18 ^{ab}
n-3 HUFA	-	28,13 ± 1,28 ^{c}	23,64 ± 2,99 ^{ab}	24,67 ± 0,95 ^{b}	23,23 ± 2,13 ^{ab}	21,78 ± 0,71 ^{a}
n-3/n-6	4,63	2,40 ± 0,10 ^{b}	2,39 ± 0,10 ^{b}	2,39 ± 0,07 ^{b}	2,33 ± 0,06 ^{a}	2,23 ± 0,06 ^{a}
EPA/DHA	-	0,61 ± 0,00 ^{c}	0,61 ± 0,01 ^{bc}	0,60 ± 0,01 ^{bc}	0,59 ± 0,02 ^{ab}	0,59 ± 0,01 ^{a}
AA/EPA	-	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,03	0,20 ± 0,02
AA/DHA	-	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,01

MUFA/n-3 HUFA	-	0,70 ± 0,03 [a]	0,73 ± 0,04 [a]	0,75 ± 0,04 [a]	0,77 ± 0,02 [a]	0,84 ± 0,03 [b]
MUFA/HUFA	-	0,66 ± 0,03 [a]	0,69 ± 0,03 [a]	0,70 ± 0,04 [a]	0,72 ± 0,02 [a]	0,78 ± 0,03 [b]
MUFA/SFA	0,43	0,61 ± 0,01 [b]	0,59 ± 0,01 [ab]	0,53 ± 0,09 [a]	0,58 ± 0,02 [ab]	0,58 ± 0,01 [ab]

Los valores representan la media ± sd (n = 4). En cada fila las diferencias significativas entre tratamientos para un mismo ácido graso se indican con distintos superíndices ($P < 0,05$).

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) en el hígado de juveniles de *S. aurata* al inicio del ensayo y tras 45 días de alimentación con los piensos experimentales.

Ácidos grasos	Inicio	CT	SC25	SC37	SC50	SC75
14:00	3,04 ± 0,02 [bc]	2,97 ± 0,20 [c]	2,83 ± 0,26 [bc]	2,42 ± 0,37 [ab]	2,63 ± 0,16 [abc]	2,20 ± 0,30 [a]
16:00	22,64 ± 0,15	23,26 ± 1,29	22,24 ± 0,96	23,24 ± 1,20	21,31 ± 1,56	21,71 ± 0,44
16:1n7	5,24 ± 0,01 [ab]	5,38 ± 0,21 [b]	5,42 ± 0,29 [b]	4,73 ± 0,30 [a]	5,34 ± 0,36 [b]	4,73 ± 0,36 [a]
16:2n4	0,76 ± 0,05 [ab]	0,71 ± 0,04 [a]	0,84 ± 0,03 [b]	0,71 ± 0,07 [a]	0,87 ± 0,02 [b]	0,87 ± 0,09 [b]
16:3n4	0,62 ± 0,01 [c]	0,59 ± 0,02 [c]	0,60 ± 0,04 [c]	0,48 ± 0,03 [a]	0,63 ± 0,12 [bc]	0,52 ± 0,08 [ab]
18:00	8,90 ± 0,03 [b]	8,89 ± 0,16 [b]	8,36 ± 0,25 [a]	10,25 ± 1,27 [c]	8,41 ± 0,43 [a]	8,91 ± 0,20 [b]
18:1n9	19,20 ± 0,40 [a]	27,05 ± 0,98 [c]	25,67 ± 2,99 [b]	34,51 ± 0,95 [f]	29,64 ± 1,23 [d]	32,17 ± 6,25 [e]
18:2n6	5,23 ± 0,05 [b]	5,78 ± 0,14 [d]	6,43 ± 0,35 [e]	4,66 ± 0,27 [a]	6,53 ± 0,75 [d]	5,71 ± 1,32 [cd]
18:3n3	0,47 ± 0,01 [a]	0,75 ± 0,08 [b]	1,62 ± 0,14 [d]	1,41 ± 0,10 [c]	2,06 ± 0,24 [f]	2,03 ± 0,54 [c]
18:4n3		0,49 ± 0,05 [a]	0,64 ± 0,06 [bc]	0,53 ± 0,06 [ab]	0,79 ± 0,07 [c]	0,77 ± 0,15 [c]
20:4n6	2,48 ± 0,04 [b]	1,49 ± 0,36 [ab]	1,58 ± 0,47 [ab]	1,14 ± 0,12 [a]	1,24 ± 0,31 [a]	1,42 ± 0,33 [a]
20:4n3	0,85 ± 0,00 [c]	0,84 ± 0,29 [b]	0,89 ± 0,12 [c]	0,61 ± 0,08 [a]	0,70 ± 0,16 [ab]	0,78 ± 0,18 [abc]
20:5n3	7,55 ± 0,01 [e]	5,80 ± 0,27 [d]	5,69 ± 0,83 [c]	3,84 ± 0,28 [a]	5,07 ± 0,21 [c]	4,42 ± 1,02 [b]
20:1n9	0,88 ± 0,00 [a]	1,15 ± 0,09 [bc]	1,15 ± 0,23 [bcd]	1,14 ± 0,04 [b]	1,19 ± 0,07 [c]	1,03 ± 0,06 [b]
22:5n3	2,40 ± 0,02 [c]	1,93 ± 0,24 [bc]	2,23 ± 0,46 [c]	1,30 ± 0,11 [ab]	1,73 ± 0,20 [abc]	1,46 ± 0,42 [ab]
22:6n3	19,38 ± 0,25 [c]	12,84 ± 1,80 [b]	13,67 ± 2,65 [bc]	8,65 ± 0,89 [a]	11,53 ± 0,36 [ab]	11,21 ± 3,02 [ab]
Saturados (SFA)	34,59 ± 0,20 [ab]	35,13 ± 1,45 [ab]	33,43 ± 1,33 [ab]	35,91 ± 2,64 [b]	32,35 ± 1,74 [a]	32,81 ± 0,80 [a]
Monoenos (MUFA)	25,32 ± 0,42 [a]	33,59 ± 1,21 [c]	32,24 ± 3,34 [b]	40,38 ± 1,06 [f]	36,17 ± 0,83 [d]	37,94 ± 6,61 [e]
HUFA	32,66 ± 0,27 [c]	22,90 ± 2,45 [b]	24,05 ± 4,18 [bc]	15,53 ± 1,45 [a]	20,27 ± 0,59 [b]	19,29 ± 4,94 [ab]
n-3	30,88 ± 0,09 [c]	22,65 ± 2,26 [bc]	24,73 ± 3,69 [bc]	16,34 ± 1,35 [a]	21,88 ± 0,84 [b]	20,68 ± 5,27 [b]
n-6	7,72 ± 0,09 [c]	7,27 ± 0,47 [b]	8,01 ± 0,53 [c]	5,80 ± 0,32 [a]	7,77 ± 0,67 [b]	7,13 ± 1,65 [b]
n-9	20,08 ± 0,41 [a]	28,21 ± 1,02 [bc]	26,82 ± 3,06 [ab]	35,65 ± 0,97 [d]	30,83 ± 1,17 [bcd]	33,21 ± 6,27 [cd]
n-3 HUFA	30,17 ± 0,23 [c]	21,41 ± 2,22 [b]	22,47 ± 3,76 [bc]	14,40 ± 1,33 [a]	19,04 ± 0,56 [ab]	17,88 ± 4,61 [ab]

n-3/n-6	4,00	±	0,06	b	3,12	±	0,21	a	3,08	±	0,36	a	2,82	±	0,13	a	2,83	±	0,13	a	2,88	±	0,19	a
EPA/DHA	3,15	±	0,02		3,02	±	0,28		2,62	±	0,50		2,95	±	0,12		2,96	±	0,30		3,09	±	0,28	
AA/EPA	0,33	±	0,01	c	0,26	±	0,06	a	0,27	±	0,06	a	0,30	±	0,02	a	0,24	±	0,06	ab	0,32	±	0,01	bc
AA/DHA	0,13	±	0,00	b	0,12	±	0,02	a	0,11	±	0,02	abc	0,13	±	0,00	c	0,11	±	0,03	abc	0,13	±	0,01	abc
MUFA/n-3 HUFA	0,84	±	0,02	a	1,59	±	0,21	ab	1,49	±	0,43	ab	2,82	±	0,24	c	1,90	±	0,08	bc	2,35	±	1,08	bc
MUFA/HUFA	0,78	±	0,02	a	1,48	±	0,20	ab	1,40	±	0,41	ab	2,62	±	0,22	b	1,79	±	0,07	b	2,18	±	0,99	b
MUFA/SFA	0,73	±	0,02	a	0,96	±	0,01	ab	0,96	±	0,09	abc	1,13	±	0,10	bc	1,12	±	0,07	bc	1,16	±	0,19	c

Los valores representan la media ± sd (n = 4). En cada fila las diferencias significativas entre tratamientos para un mismo ácido graso se indican con distintos superíndices ($P < 0,05$).

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) en el músculo de juveniles de *S. aurata* al inicio del ensayo y tras 45 días de alimentación con los piensos experimentales.

Ácidos grasos	Inicio	CT	SC25	SC37	SC50	SC75
14:00	3,81 ± 0,01 ^{d}	3,54 ± 0,07 ^{c}	3,33 ± 0,24 ^{c}	3,20 ± 0,04 ^{b}	3,11 ± 0,07 ^{b}	2,97 ± 0,16 ^{a}
16:00	20,78 ± 0,06 ^{a}	22,27 ± 0,47 ^{b}	21,71 ± 0,31 ^{ab}	22,03 ± 0,52 ^{b}	21,69 ± 0,20 ^{ab}	22,16 ± 0,53 ^{b}
16:1n7	6,72 ± 0,03 ^{c}	0,71 ± 0,15 ^{c}	0,75 ± 0,44 ^{c}	0,72 ± 0,34 ^{b}	0,72 ± 0,35 ^{bc}	0,78 ± 2,07 ^{a}
16:2n4		0,72 ± 0,04 ^{b}	0,64 ± 0,02 ^{ab}	0,58 ± 0,03 ^{ab}	0,56 ± 0,03 ^{a}	0,72 ± 0,02 ^{b}
16:3n4		0,41 ± 0,02 ^{c}	0,40 ± 0,07 ^{b}	0,38 ± 0,04 ^{a}	0,37 ± 0,05 ^{a}	0,36 ± 0,05 ^{bc}
18:00	6,19 ± 0,05 ^{c}	5,97 ± 0,16 ^{abc}	5,86 ± 0,22 ^{a}	6,04 ± 0,17 ^{abc}	6,03 ± 0,04 ^{a}	6,35 ± 0,28 ^{c}
18:1n9	15,88 ± 0,13 ^{a}	23,04 ± 0,34 ^{b}	23,78 ± 0,99 ^{b}	23,90 ± 0,40 ^{b}	23,23 ± 0,59 ^{b}	24,26 ± 1,01 ^{b}
18:2n6	6,51 ± 0,06 ^{a}	6,89 ± 0,18 ^{a}	7,32 ± 0,27 ^{b}	7,28 ± 0,04 ^{b}	7,46 ± 0,13 ^{b}	7,87 ± 0,38 ^{c}
18:3n3	0,86 ± 0,01 ^{a}	0,95 ± 0,11 ^{a}	2,23 ± 0,53 ^{b}	2,64 ± 0,07 ^{c}	2,61 ± 0,07 ^{c}	3,15 ± 0,57 ^{d}
18:4n3	0,98 ± 0,09 ^{c}	0,72 ± 0,05 ^{a}	0,81 ± 0,06 ^{ab}	0,82 ± 0,07 ^{abc}	0,86 ± 0,01 ^{bc}	0,83 ± 0,09 ^{abc}
20:4n6	1,57 ± 0,02	1,06 ± 0,20	1,08 ± 0,08	1,08 ± 0,04	1,12 ± 0,04	1,09 ± 0,05
20:4n3		0,88 ± 0,12	0,88 ± 0,03	0,90 ± 0,03	0,94 ± 0,05	0,91 ± 0,07
20:5n3	11,06 ± 0,12 ^{c}	7,49 ± 0,16 ^{b}	7,08 ± 0,27 ^{a}	6,89 ± 0,15 ^{a}	7,08 ± 0,17 ^{a}	6,87 ± 0,33 ^{a}
20:1n9	0,92 ± 0,02 ^{a}	1,29 ± 0,04 ^{c}	1,24 ± 0,12 ^{bc}	1,22 ± 0,09 ^{bc}	1,13 ± 0,06 ^{b}	1,19 ± 0,13 ^{bc}
22:5n3	3,94 ± 0,11 ^{c}	2,45 ± 0,06 ^{ab}	2,48 ± 0,17 ^{b}	2,30 ± 0,08 ^{a}	2,34 ± 0,04 ^{a}	2,33 ± 0,15 ^{a}
22:6n3	20,03 ± 0,42 ^{c}	14,33 ± 0,41 ^{b}	13,90 ± 0,80 ^{ab}	13,73 ± 0,31 ^{a}	14,42 ± 0,56 ^{ab}	13,88 ± 0,76 ^{ab}
Saturados (SFA)	30,77 ± 0,12	31,78 ± 0,65	30,90 ± 0,42	31,27 ± 0,65	30,84 ± 0,29	31,48 ± 0,74
Monoenos (MUFA)	23,53 ± 0,18 ^{a}	31,59 ± 0,50 ^{b}	31,72 ± 0,90 ^{b}	31,52 ± 0,41 ^{b}	30,81 ± 0,44 ^{b}	30,61 ± 1,65 ^{b}
HUFA	36,59 ± 0,63 ^{c}	26,22 ± 0,55 ^{b}	25,43 ± 1,16 ^{ab}	24,90 ± 0,54 ^{a}	25,89 ± 0,77 ^{ab}	25,08 ± 1,26 ^{a}
n-3	36,87 ± 0,73 ^{c}	26,83 ± 0,45 ^{a}	27,39 ± 0,89 ^{ab}	27,29 ± 0,49 ^{ab}	28,25 ± 0,68 ^{b}	27,96 ± 0,76 ^{ab}
n-6	8,08 ± 0,04 ^{ab}	7,95 ± 0,32 ^{a}	8,39 ± 0,30 ^{ab}	8,36 ± 0,04 ^{ab}	8,58 ± 0,15 ^{bc}	8,96 ± 0,35 ^{c}
n-9	16,81 ± 0,15 ^{a}	24,33 ± 0,36 ^{b}	25,03 ± 1,02 ^{b}	25,12 ± 0,42 ^{b}	24,36 ± 0,61 ^{b}	25,45 ± 0,99 ^{b}
n-3 HUFA	35,02 ± 0,65 ^{c}	25,15 ± 0,47 ^{b}	24,35 ± 1,10 ^{ab}	23,82 ± 0,51 ^{a}	24,78 ± 0,74 ^{ab}	23,99 ± 1,22 ^{a}
n-3/n-6	4,56 ± 0,07 ^{c}	3,38 ± 0,14 ^{b}	3,27 ± 0,12 ^{ab}	3,26 ± 0,05 ^{ab}	3,29 ± 0,04 ^{ab}	3,13 ± 0,17 ^{a}

EPA/DHA	2,81 ± 0,05 [ab]	3,06 ± 0,13 [c]	2,86 ± 0,11 [a]	3,00 ± 0,07 [abc]	3,02 ± 0,04 [bc]	2,95 ± 0,09 [abc]
AA/EPA	0,14 ± 0,00 [a]	0,14 ± 0,03 [ab]	0,15 ± 0,01 [ab]	0,16 ± 0,00 [b]	0,16 ± 0,00 [b]	0,16 ± 0,00 [b]
AA/DHA	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00
MUFA/n-3 HUFA	0,67 ± 0,01 [a]	1,26 ± 0,04 [b]	1,31 ± 0,09 [b]	1,32 ± 0,04 [b]	1,24 ± 0,05 [b]	1,28 ± 0,10 [b]
MUFA/HUFA	0,64 ± 0,01 [a]	1,21 ± 0,04 [b]	1,25 ± 0,09 [b]	1,27 ± 0,03 [b]	1,19 ± 0,05 [b]	1,22 ± 0,10 [b]
MUFA/SFA	0,76 ± 0,00 [a]	0,99 ± 0,03 [b]	1,03 ± 0,03 [b]	1,01 ± 0,03 [b]	1,00 ± 0,01 [b]	0,97 ± 0,07 [b]

Los valores representan la media ± sd (n = 4). En cada fila las diferencias significativas entre tratamientos para un mismo ácido graso se indican con distintos superíndices ($P < 0,05$).

Estudio de las actividades enzimáticas digestivas

Este estudio se realizó con el objetivo de conocer cuál es la influencia de la inclusión de *S. almeriensis* sobre las actividades enzimáticas digestivas en juveniles de dorada. En el análisis se han considerado dos grupos de enzimas distintas: i) aquellas indicadoras de la capacidad digestiva como son la proteasa alcalina total, tripsina, quimotripsina y amilasa, y ii) aquellas otras que se pueden utilizar como marcadores de la capacidad de absorción a nivel intestinal como la fosfatasa alcalina y la aminopeptidasa.

La Tabla 7 muestra los valores obtenidos para cada una de estas actividades en función del alimento que se suministró a los peces. La inclusión de *S. almeriensis* no ejerció un efecto negativo sobre las actividades enzimáticas estudiadas. De forma general, los peces alimentados con piensos suplementados con la microalga presentaron unos niveles de actividad más altos que los peces alimentados con el pienso control, observándose en algunas actividades como son la tripsina, la fosfatasa alcalina y la aminopeptidasa, la existencia de diferencias significativas respecto al control. De manera más específica, los individuos alimentados con los piensos SC25 y SC37 mostraron mayores niveles de actividad, destacando la fosfatasa alcalina y la aminopeptidasa en los peces alimentados con SC37, y la tripsina en los alimentados con SC25.

Con el propósito de visualizar las proteasas intestinales presentes en los extractos intestinales se realizó un zimograma para analizar si la inclusión de biomasa algal modificó el patrón de enzimas de los peces. En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos para los peces de cada tratamiento, observándose que todos ellos presentan un patrón de proteasas similar caracterizado por cinco enzimas proteolíticas claramente visibles.

Tabla 7. Actividades enzimáticas digestivas (U/g tejido) en los juveniles de dorada alimentados con piensos que contienen biomasa algal (media ± DS).

Actividad enzimática	Control	SC25	SC37	SC50	SC75
Capacidad digestiva					
Proteasa alcalina (x1000)	2,13 ± 0,47	2,26 ± 0,54	2,38 ± 0,864	2,23 ± 0,673	2,79 ± 0,659
Tripsina	0,20 ± 0,03^{b}	0,25 ± 0,03^{a}	0,21 ± 0,04^{ab}	0,23 ± 0,04^{ab}	0,23 ± 0,04^{ab}
Quimotripsina	5,05 ± 1,99	6,67 ± 0,98	5,31 ± 1,46	5,57 ± 0,88	5,56 ± 1,61
Amilasa	1,77 ± 0,87	1,77 ± 0,31	1,96 ± 0,44	1,79 ± 0,48	2,06 ± 0,50
Capacidad de absorción					
Leucina aminopeptidasa	0,77 ± 0,10^{c}	1,05 ± 0,25^{ab}	1,10 ± 0,43^{a}	0,92 ± 0,13^{ab}	0,72 ± 0,19^{c}
Fosfatasa alcalina	29,33 ± 5,13^{b}	33,13 ± 9,76^{ab}	38,62 ± 9,70^{a}	29,88 ± 4,74^{ab}	23,87 ± 4,56^{b}

En cada fila, los valores con distinto superíndice presentan diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,01$).

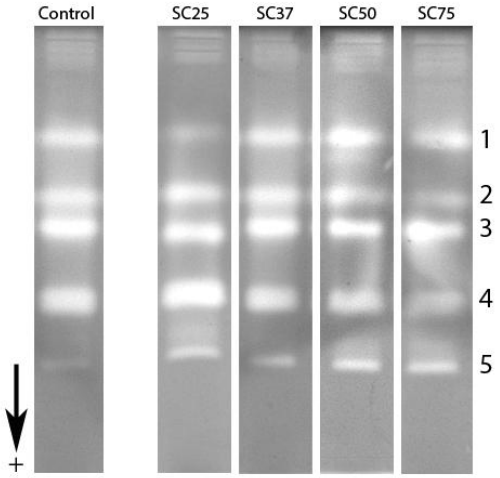

Figura 1. Substrato-SDS-PAGE de los extractos intestinales de los juveniles de *S. aurata* alimentados con piensos que incluyen distinta proporción de harina algal. En cada carril se incluyeron 2 unidades de actividad proteasa alcalina de un extracto enzimático elaborado a partir de los tejidos de 3 peces distintos de un mismo tratamiento.

Estudio de la presencia de factores antinutritivos en la biomasa algal y en los piensos experimentales.

Para evaluar la presencia de sustancias antinutritivas se realizó un ensayo de inhibición empleando como potencial solución inhibitoria cada uno de los extractos preparados a partir de la harina de microalga y los piensos experimentales. Los resultados obtenidos indican que ni la biomasa algal ni las dietas experimentales contienen sustancias que tengan la capacidad de inhibir a las proteasas digestivas de los ejemplares juveniles de dorada (resultados no mostrados). Además, este resultado corrobora el hecho de que en el zimograma (Figura 4) no se evidencie alteración alguna del patrón de bandas característico de la dorada cuando los ejemplares son alimentados con los distintos piensos experimentales.

Estudio de la estructura histológica del hígado e intestino

La estructura tisular del hígado de los ejemplares de *S. aurata* se muestra en la Figura 2. En general, a menor aumento no se apreció la existencia de alteraciones estructurales en el tejido hepático como consecuencia de la ingesta de piensos que incluyesen *S. almeriensis*. En todos los casos los hepatocitos presentaron núcleos ligeramente excéntricos y polarizados hacia el centro de las rosetas y, en su conjunto, dirigidos hacia los capilares hepáticos ramificados (Figura 2A, B, E y F). A mayor detalle se evidenció que las doradas alimentadas con SC37 presentaron algunos hepatocitos ligeramente mayores, con cierto grado de vacuolización intracelular (véase Figura 2D). A pesar de lo anterior, los peces alimentados con microalgas mostraron hepatocitos normales, con núcleos evidentes y con patentes nucleolos, y una abundante ramificación de los capilares y sinusoides, observándose en general una estructura tisular compacta. Los acinos pancreáticos contenidos en hígado presentaron una apariencia normal con patentes gránulos de zimógeno (Figura 2E y C).

La estructura tisular del intestino de los peces se muestra en las Figuras 3 y 4. En la Figura 3 se ilustra el tejido intestinal de las doradas del tratamiento control. La morfología del intestino proximal (IP) y del distal (ID) mostraron una apariencia normal, con vellosidades largas en las que los enterocitos se disponen regularmente con sus núcleos alineados (véase en la Figura 3A la disposición típica de los núcleos de los enterocitos en la vellosidad a modo de "dedos en un guante"). Se observan células mucosas distribuidas de forma regular a lo largo de las vellosidades intestinales. Las microvellosidades intestinales se aprecian como una banda más densa en la superficie de la mucosa (véase la Figura 3D). La lamina propria está constituida por una delgada capa de células en la base de los enterocitos, y en ella se aprecian leucocitos distribuidos de forma regular, siendo ambos hallazgos característicos de una mucosa intestinal sana. En la Figura 4 se muestra el detalle de la estructura histológica del intestino proximal de los peces alimentados con piensos que incluyen *S. almeriensis*. En general, el estudio histológico reveló que no se producen alteraciones de la estructura tisular en comparación con los peces del tratamiento control, a excepción del ligero incremento en el número de células caliciformes observado en el intestino proximal de algunos de los peces alimentados con SC50 (Figura 4G).

A partir de las imágenes obtenidas al microscopio del hígado se estimó la longitud del eje mayor y el área de los hepatocitos (Tabla 8). En general, los hepatocitos de los peces alimentados con SC50 presentaron un tamaño menor que en el resto de los tratamientos. Los valores del eje mayor fueron menores en SC50, aunque solo con diferencias significativas respecto a los peces de SC75. Por su parte, el área de los hepatocitos fue significativamente menor en SC50 ($P < 0,05$).

La Tabla 9 muestra los valores resultantes tras las mediciones realizadas en las preparaciones histológicas de intestino. Todos los peces alimentados con piensos que incluyen harina algal mostraron una mayor longitud de las vellosidades en el intestino distal respecto al control. En cuanto a la altura de los enterocitos, en general ésta fue mayor en los piensos que incluían *S. almeriensis*, aunque sin presentar diferencias significativas respecto al control.

Tabla 8. Longitud del eje mayor y área de los hepatocitos en los ejemplares juveniles de *S. aurata* alimentados con los piensos experimentales (media ± sd, n = 4 individuos).

Tratamiento	Longitud del eje mayor (µm)				Área (µm^2)			
SC25	21,82	±	3,00	ab	238,55	±	55,13	b
SC37	21,50	±	3,25	ab	230,88	±	68,51	b
SC50	19,96	±	2,49	a	192,85	±	42,93	a
SC75	22,09	±	3,16	b	234,46	±	45,56	b

En cada variable las diferencias significativas se indican con distintos superíndices ($P < 0,05$).

Tabla 9. Altura de las vellosidades y de los enterocitos del intestino proximal y distal de los juveniles de *S. aurata* alimentados con los piensos experimentales (media ± sd, n = 4 individuos).

		Altura de las vellosidades (µm)				Altura de los enterocitos(µm)			
Intestino proximal	**Control**	560,61	±	174,87		35,97	±	9,08	ab
	SC25	533,67	±	228,92		38,01	±	7,36	ab
	SC37	451,20	±	144,29		32,74	±	9,38	a
	SC50	526,59	±	189,21		44,31	±	6,70	b
	SC75	618,15	±	201,87		43,40	±	8,97	ab
Intestino distal	**Control**	334,90	±	125,51	a	41,81	±	12,87	ab
	SC25	450,06	±	153,05	ab	48,24	±	15,64	b
	SC37	560,61	±	174,87	bc	35,97	±	9,08	a
	SC50	566,95	±	145,09	bc	46,12	±	7,18	ab
	SC75	657,85	±	92,95	c	42,13	±	16,05	ab

En cada variable las diferencias significativas se indican con distintos superíndices ($P < 0,05$).

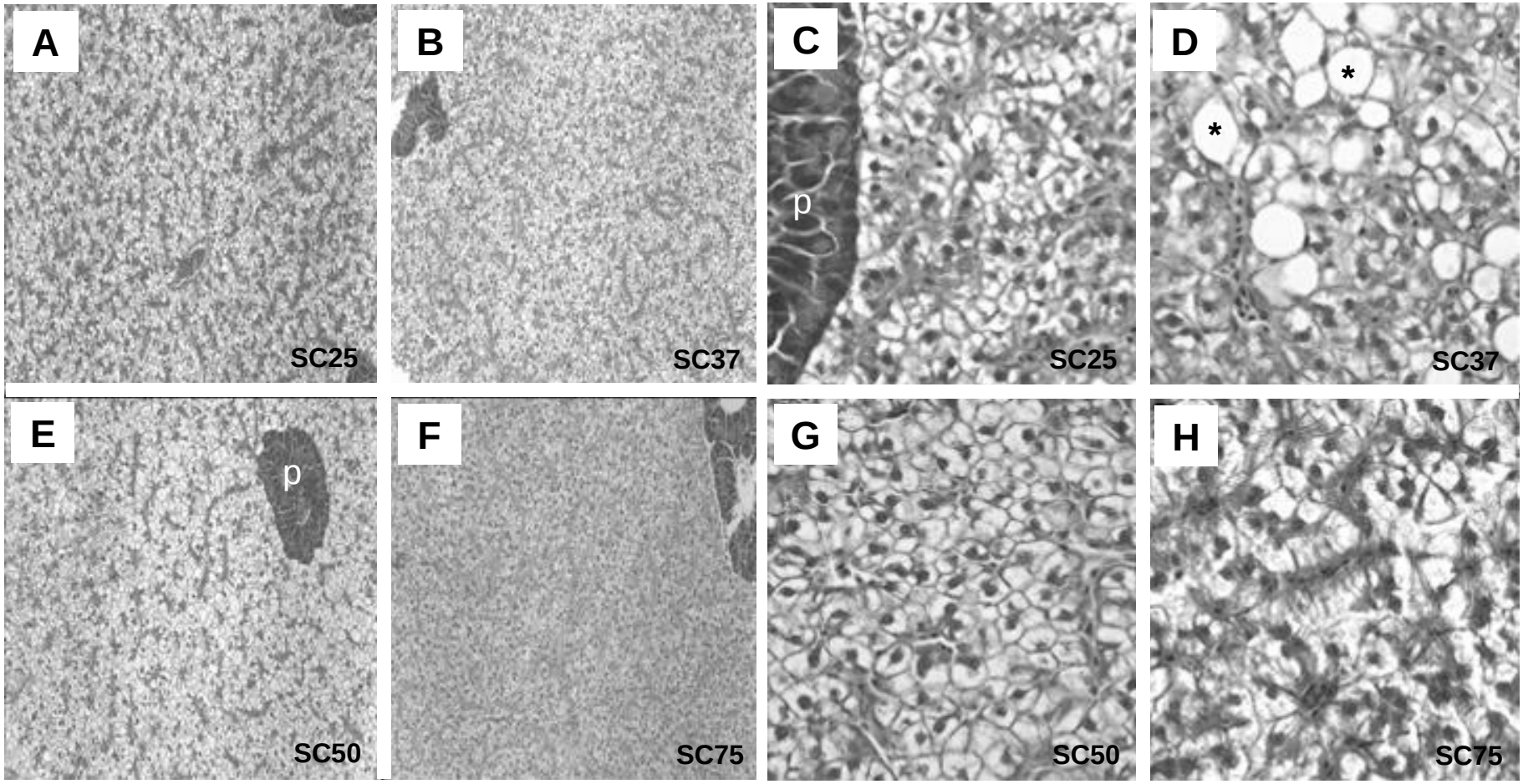

Figura 2**.** Detalle de la estructura tisular del hígado en los ejemplares juveniles de *S. aurata* alimentados con SC25 (A y C), SC37 (B y D), SC50 (E y G), y SC75 (F y H). En A, B, E y F: Tinción H&E, 40X. En C, D, G y H: Tinción H&E, 400 X. (p: tejido pancreático, * inclusiones lipídicas).

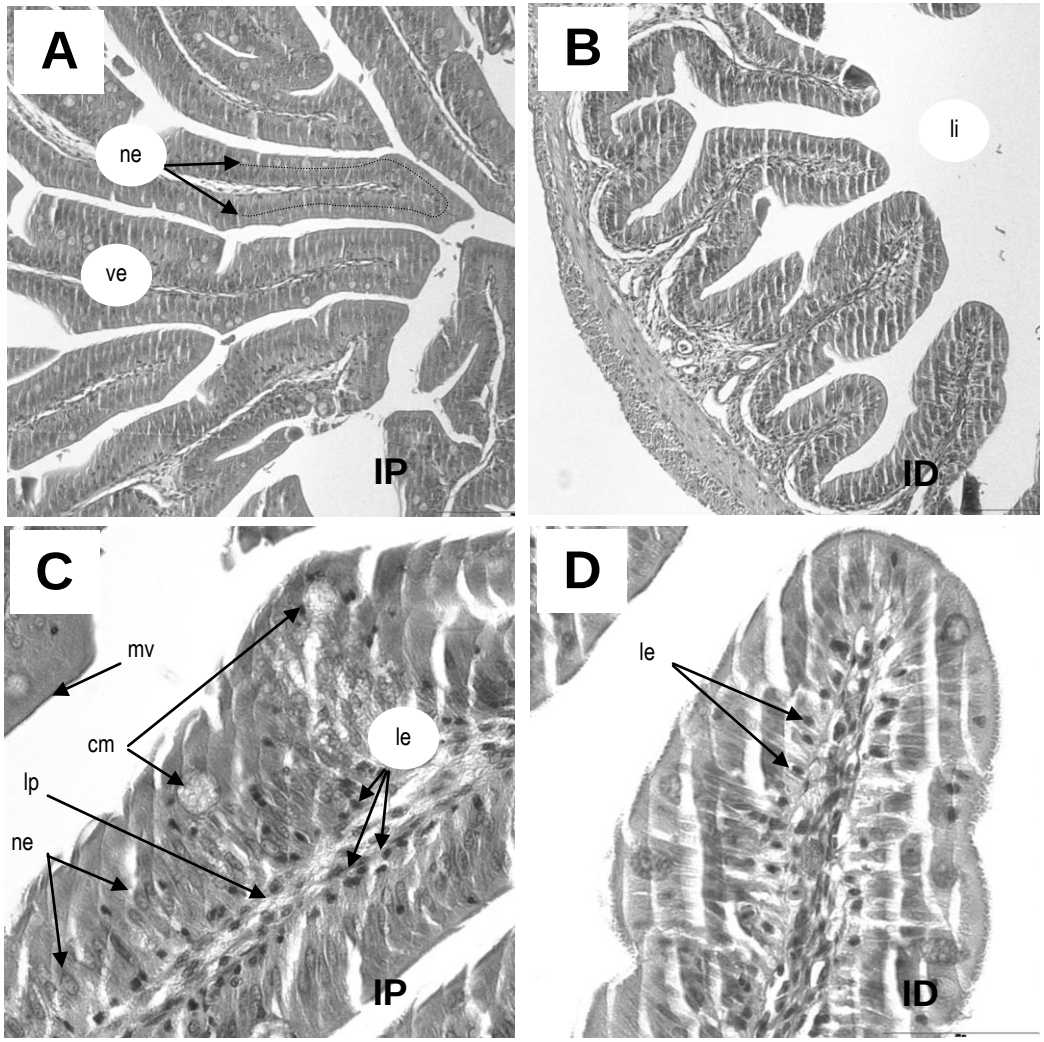

Figura 3. Detalle de la estructura tisular del intestino proximal (IP en A y C) y distal (ID en B y D) de los ejemplares juveniles de *S. aurata* alimentados con el pienso control (CT). En A y B: Tinción H&E, 40X. En C y D: Tinción H&E, 400 X. (cm: células mucosas, le: leucocitos, li: luz intestinal, lp: lamina propria, mv: microvellosidades intestinales, ne: núcleos de los enterocitos, ve: vellosidad intestinal).

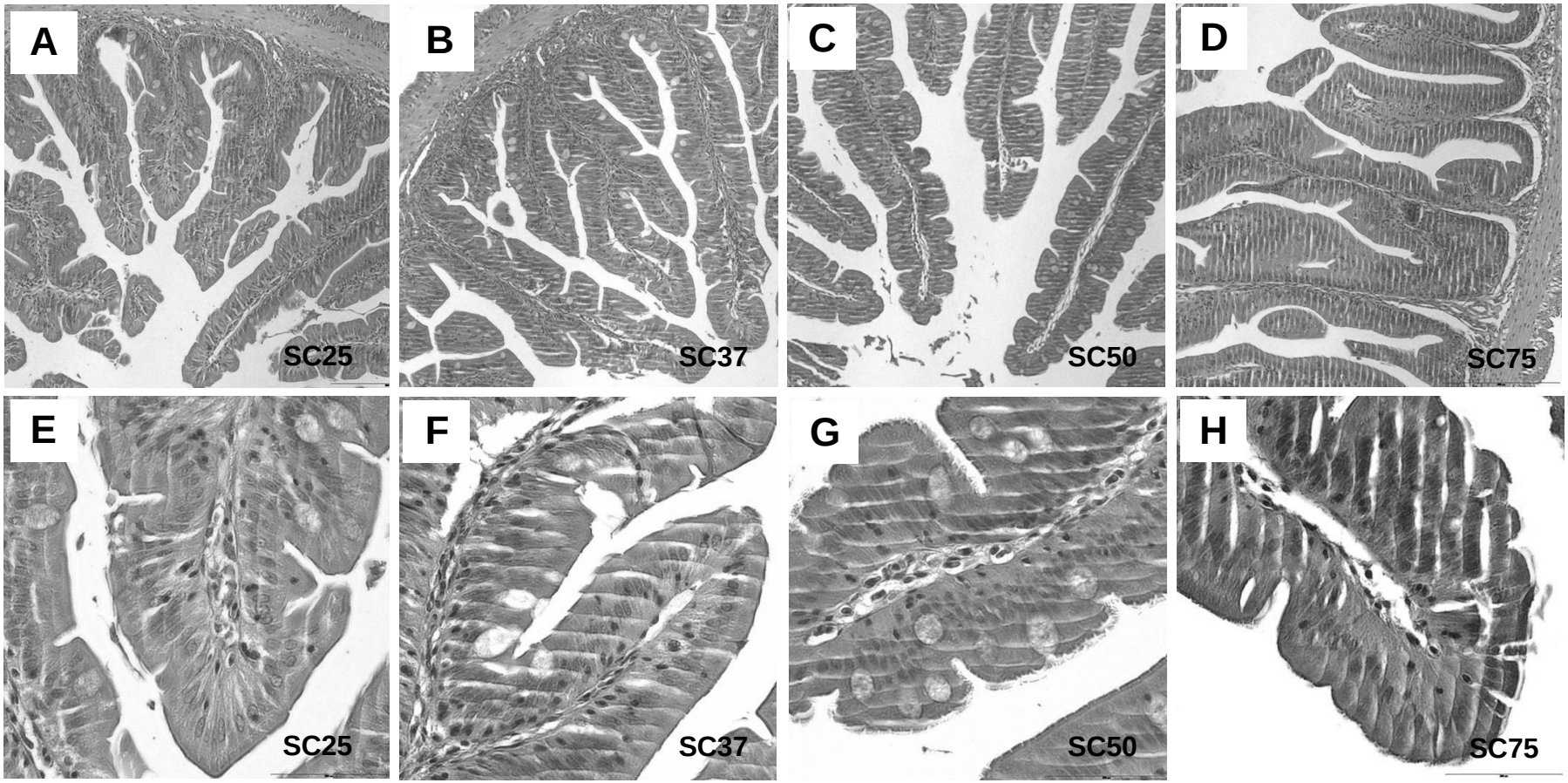

Figura 4. Detalle de la estructura tisular del intestino proximal en los ejemplares juveniles de *S. aurata* alimentados con SC25 (A y E), SC37 (B y F), SC50 (C y G), y SC75 (D y H). En A, B, C y D: Tinción H&E, 40X. En E, F, G y H: Tinción H&E, 400 X.

.

Estudio de la ultraestructura de la mucosa intestinal

Con el propósito de estudiar el efecto de la suplementación con *S. almeriensis* sobre la estructura de la mucosa intestinal se obtuvieron una serie de imágenes tanto por TEM como por SEM para la zona proximal del intestino. Estas imágenes se analizaron mediante el programa de software libre UTHSCA ImageTool para conocer y comparar el efecto que produce cada uno de los tratamientos en la superficie de absorción de nutrientes.

Las Figuras 5 y 6 muestran algunas de las imágenes TEM y SEM obtenidas del intestino proximal. A partir de las mediciones efectuadas sobre las imágenes TEM se comprobó la existencia de diferencias significativas en la altura de las microvellosidades intestinales (Figura 5). En concreto en los peces de los tratamientos SC37 y SC75, la altura de éstas fue casi del doble de magnitud que la presente en los peces de los demás tratamientos. También se apreciaron diferencias significativas en la superficie apical de los enterocitos (Figura 6), que también fue mayor en los animales alimentados con los piensos SC37 y SC75.

La Tabla 10 recoge los resultados del análisis morfométrico efectuado a partir de las imágenes con el programa UTHSCA ImageTool. En general, los peces alimentados con microalgas presentaron mayor altura y diámetro de sus microvellosidades intestinales y sus enterocitos fueron de mayor tamaño. De igual forma, la superficie de absorción por enterocito fue significativamente mayor en los peces alimentados con microalgas que en los animales del control. En particular, los peces de los grupos SC37 y SC75 presentaron los valores más altos llegando a superar de forma notable los valores obtenidos con el pienso Control.

De los resultados obtenidos es evidente que en la zona proximal del intestino la suplementación con *S. almeriensis* ocasiona un incremento en la superficie de absorción de la mucosa intestinal. El valor máximo en el intestino proximal se alcanzó con SC37.

Tabla 10. Resultados (media ± sd) del análisis morfométrico efectuado en la mucosa del intestino proximal a partir de las imágenes TEM y SEM. Los valores con distinto superíndice indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,01$).

Parámetros	**Control**	**SC25**	**SC37**	**SC50**	**SC75**
Altura microvilli (µm)	$2,07\pm0,25^{b}$	$1,83\pm0,17^{c}$	$2,64\pm0,66^{a}$	$1,57\pm0,09^{d}$	$1,95\pm0,50^{c}$
Diámetro microvilli (µm)	$0,09\pm0,01^{d}$	$0,12\pm0,01^{b}$	$0,12\pm0,01^{b}$	$0,14\pm0,01^{a}$	$0,10\pm0,01^{c}$
Área apical enterocito (μm^2)	$11,3\pm4,0^{c}$	$18,9\pm5,2^{b}$	$28,8\pm4,1^{a}$	$14,2\pm3,8^{c}$	$20,6\pm3,1^{b}$
Superficie absorción/enterocito (μm^2)	$693,9\pm82,0^{d}$	$769,2\pm72,2^{c}$	$1522,6\pm379,6^{a}$	$414,1\pm23,6^{e}$	$1014,1\pm256,9^{b}$

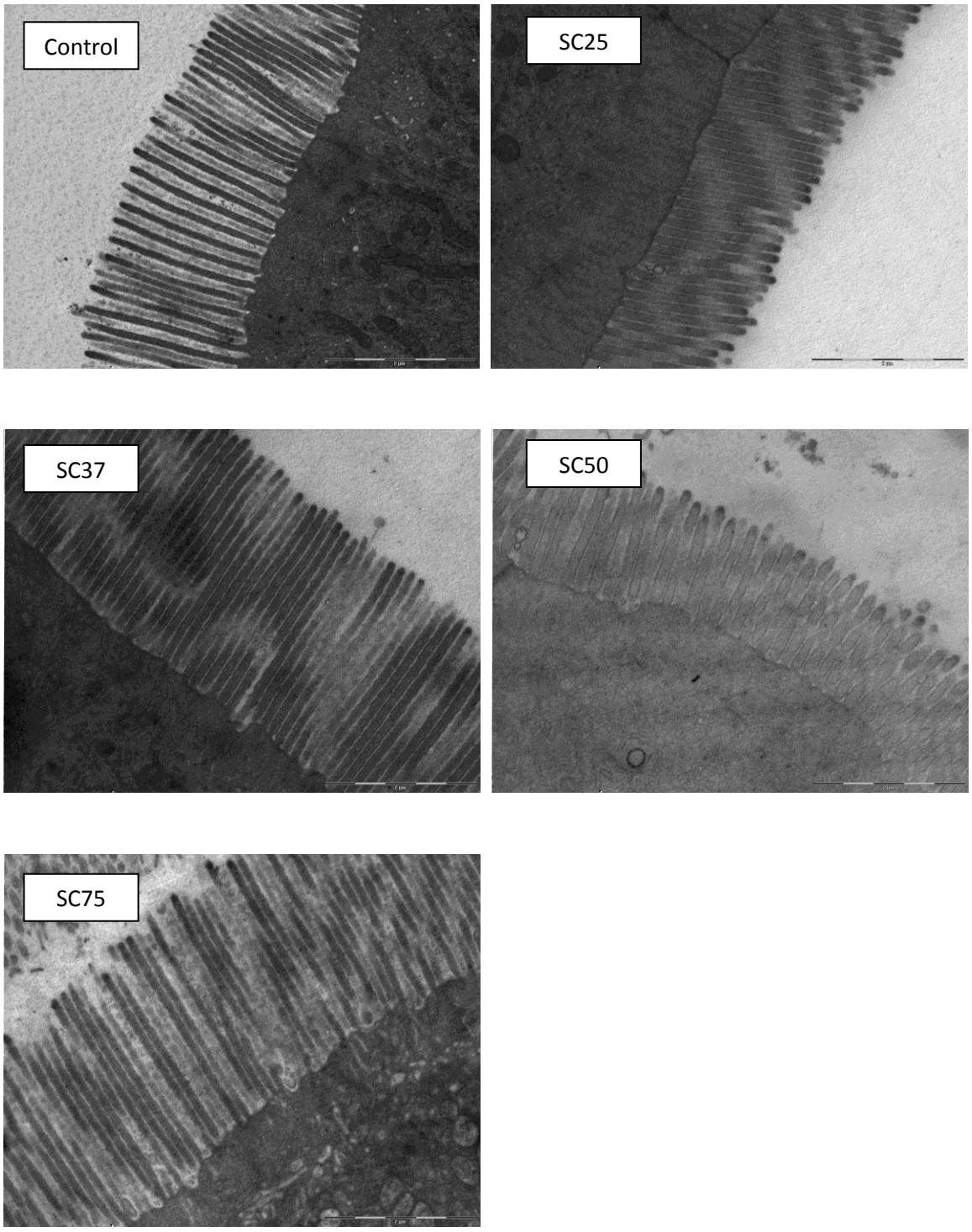

Figura 5. Detalle de las microvellosidades intestinales del intestino proximal de los juveniles de dorada alimentados con pienso control, SC25, SC37, SC50 y SC75. Imágenes TEM (en el margen inferior derecho se indica la escala de cada imagen).

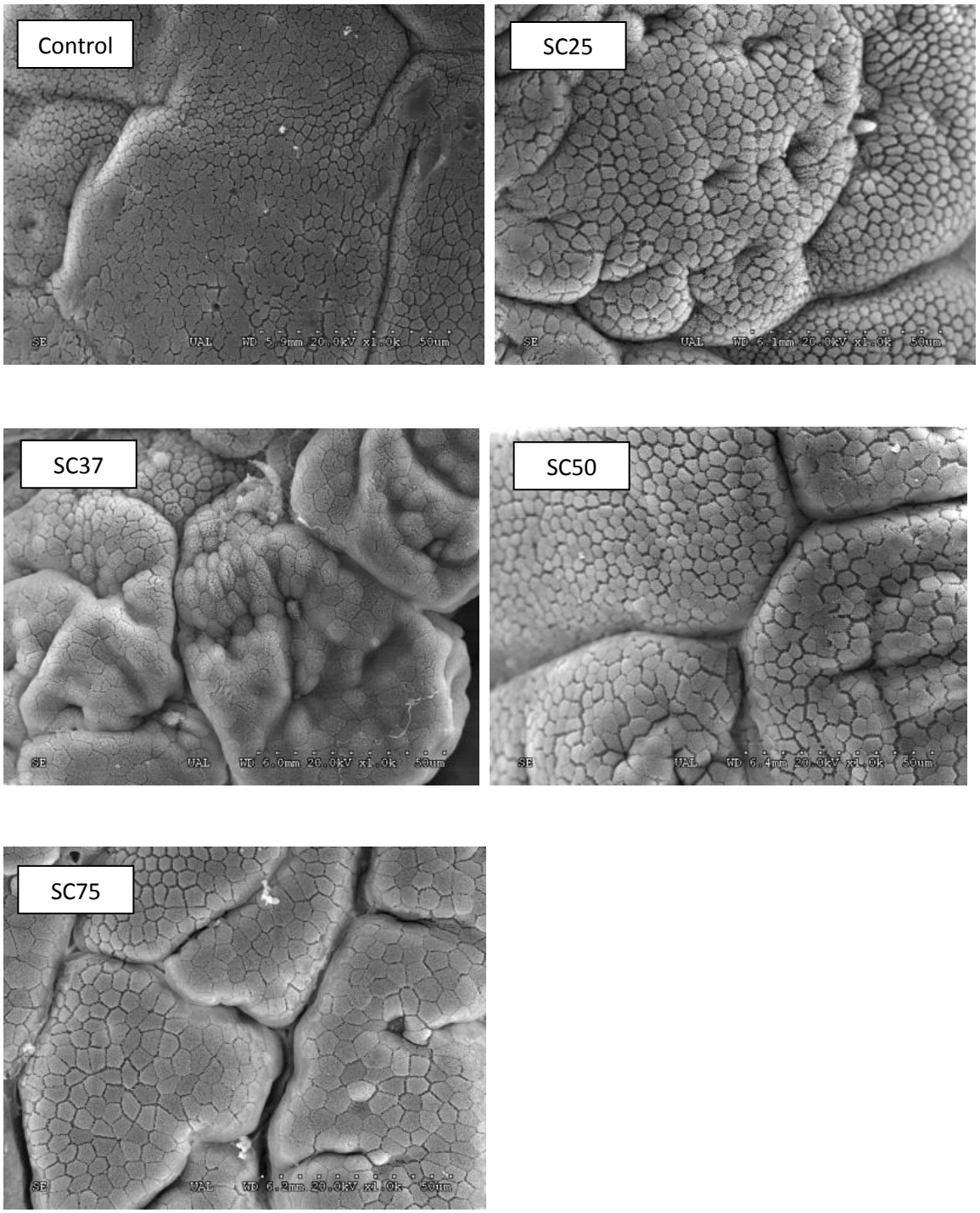

Figura 6. Detalle de la cara apical de los enterocitos del intestino proximal de los juveniles de dorada alimentados con pienso control, SC25, SC37, SC50 y SC75. Imágenes SEM (en el margen inferior derecho se indica la magnificación de cada imagen).

Análisis global de los resultados

Con el propósito de realizar una evaluación global del agrupamiento de los distintos tratamientos experimentales y ver la similitud entre ellos se realizó un análisis de clúster. Por un lado se utilizaron los parámetros zootécnicos contenidos en la Tabla 2 y de otro se realizó un segundo dendrograma considerando en el análisis todas las variables obtenidas en el estudio (parámetros zootécnicos, datos del estudio histológico, composición proximal, y de ácidos grasos del hígado y músculo). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7, y evidencian una fuerte separación de los tratamientos SC25 y SC75 del resto, cuando en el estudio se consideraron únicamente los parámetros zootécnicos (Figura 7A). Los tratamientos SC37 y SC50 aparecen más cercanos al control, con un 16% y un 8% de similitud, respectivamente. Por otra parte, en la Figura 7B se muestra el dendrograma cuando se utilizan todas las variables. En este caso SC25, SC50 y SC75 quedan claramente separados del resto de tratamientos, y finalmente la dieta SC37 se muestra más cercana al alimento control.

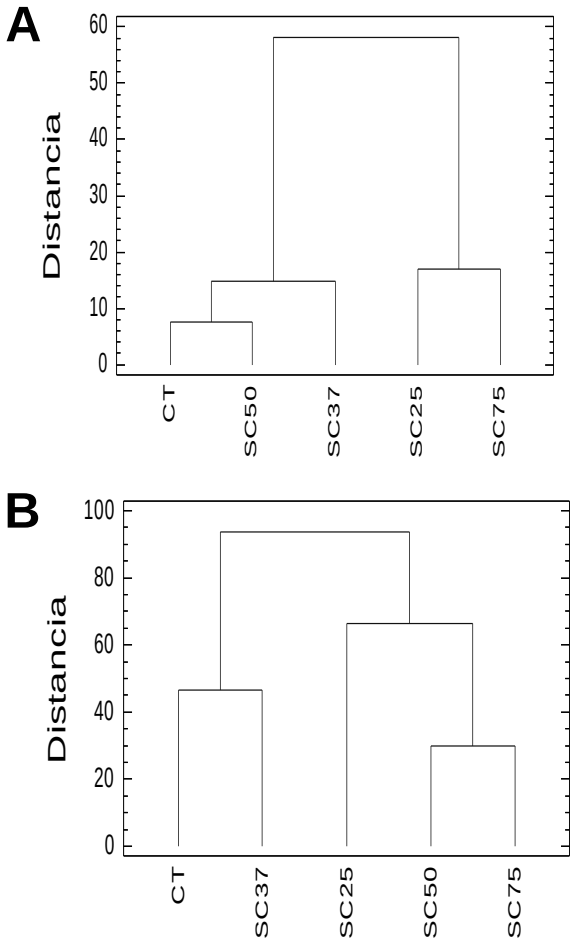

Figura 7. Resultados del análisis de clúster multivariante realizado con (A) los parámetros zootécnicos y (B) con todos los parámetros (zootécnicos, perfil de ácidos grasos, variables del estado inmune, datos histológicos y composición proximal) obtenidos en el estudio.

Evaluación económica de la inclusión de *S. almeriensis* en piensos para peces marinos carnívoros

La Tabla 11 recoge los datos, resultados de la evaluación económica derivada de sustituir la harina de pescado por biomasa de *S. almeriensis* en los piensos para juveniles de dorada. Para el cálculo se han considerado dos precios hipotéticos, i) por un lado un valor de 7 € kg^{-1} que ha sido propuesto para la biomasa de la especie *Phaeodactylum tricornutum* que es una microalga cuya composición bioquímica es muy similar a *S. almeriensis* (Belarbi *et al*.

2000) y, ii) de otro 12,6 € kg^{-1} propuesto por Acién *et al*. (2012) para esta misma especie cuando se producen en planta 200 ton $año^{-1}$. La diferencia de precio de mercado entre los derivados del pescado y la biomasa microalgal determina que se produzca un notable sobrecoste del producto final a medida que se incrementan los niveles de microalga en el pienso, a pesar de que paralelamente se reduce la proporción de materias primas derivadas de la pesca extractiva. Cuando se utiliza un nivel de sustitución del 25%, el precio hipotético del pienso se incrementa entre 0,7 y 1,4 veces (según el precio de la biomasa algal considerado) en comparación con un alimento elaborado básicamente con derivados del pescado.

Tabla 10. Evaluación económica hipotética derivada de la sustitución de la harina de pescado por biomasa de *S. almeriensis* en piensos comerciales para el preengorde de *S. aurata*.

	Control	**SC25**	**SC37**	**SC50**	**SC75**
Opción 1: Gasto 1 en *S. almeriensis* (€/t)[1]	-	903	1.358	1.806	2.709
Opción 2: Gasto 2 en *S. almeriensis* (€/t)[1]	-	1.625,4	2.444,4	3.250,8	4.876,2
Ahorro en derivados del pescado (€/t)		90	136	181	273
Precio Opción 1 (€/kg)[3]	0,59	1,31	1,67	2,03	2,75
Precio Opción 2 (€/kg)[3]	0,59	2,03	2,76	3,48	4,92
Incremento precio Opción 1 (€/kg)	-	0,72	1,09	1,44	2,16
Incremento precio Opción 2 (€/kg)	-	1,44	2,17	2,89	4,33

[1] Gasto 1: 7 €/kg de harina microalgal. Gasto 2: 12,6 €/kg harina microalgal. [2] Los precios utilizados para las estimaciones realizadas son 1,09 €/kg para la harina de pescado (valor medio en 2011 para la harina de pescado chilena con 65% de proteína, según el Fondo Monetario Internacional, http://www.imf.org) y 1,06 €/kg para el aceite de pescado (valor medio de 2011 según la FAO, http://dx.doi.org/10.1787/888932428253). [3] Estimación del gasto en derivados de pescado y en microalgas por cada kg de pienso. No se incluyen en el estudio los gastos derivados de otros macronutrientes, aditivos, microelementos, maquinaria, etc.,

La Figura 8 muestra la representación del análisis de coste-beneficio considerando, por un lado el incremento del precio del pienso estimado con los dos precios distintos de la biomasa *S. almeriensis*, y de otro el balance FIFO (Fish In–Fish Out) resultante de sustituir la harina de pescado por biomasa algal. A partir de la representación se puede determinar el punto de equilibrio entre ambos factores con el propósito de determinar si los posibles beneficios derivados (fundamentalmente medioambientales al reducir la presión por pesca

extractiva) de la reducción de harina de pescado están en proporción con el incremento de los costes derivados del uso de biomasa microalgal. De la gráfica se desprende que, cuando se considera al balance FIFO como principal beneficio de la reducción del uso de la harina de pescado, los valores recomendables de inclusión de *S. almeriensis* son un 43,5% y 75% para la Opción 1 y 2, respectivamente.

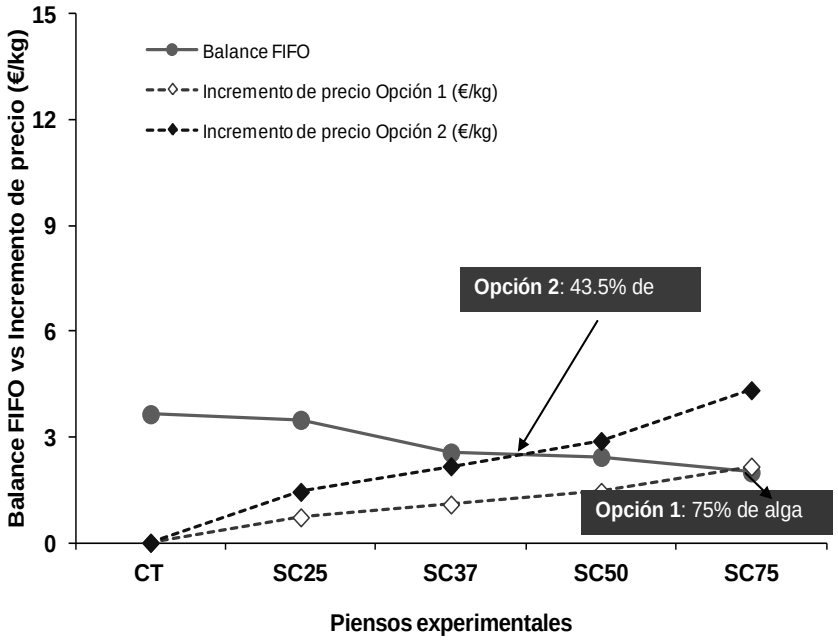

Figura 8. Análisis de costes-beneficios derivados de la sustitución progresiva de harina de pescado por biomasa de *S. almeirensis* en piensos para el preengorde comercial de *S. aurata*.

Discusión

La utilización de harinas derivadas de macroalgas y microalgas en la alimentación de peces de agua dulce y agua marina ha sido descrita con anterioridad por numerosos autores (Appler & Jauncey, 1983; Nakagawa *et al*. 1997; Lu *et al*. 2004; Kumar *et al*. 2004; Atalah *et al*. 2007; Dallaire *et al*. 2007; Hasan & Chakrabarti, 2009; Rico, 2012). En particular, las microalgas han sido identificadas como un potencial recurso de proteínas para la alimentación animal debido a su alto contenido proteico con una proporción interesante de aminoácidos esenciales, así como de vitaminas y minerales. En este sentido las microalgas

y sus derivados constituyen una fuente proteica alternativa de interés en producción acuícola (Ehremberg, 1980).

Crecimiento y aprovechamiento nutritivo de los piensos

Son numerosos los estudios publicados hasta la fecha que describen los efectos de la utilización de los derivados de harinas de microalgas y pastos marinos sobre el crecimiento de peces marinos cuando los primeros se utilizan como aditivos o componentes secundarios en la alimentación de los segundos. Por ejemplo, Mustafa *et al*. (1994) describen que un nivel de inclusión del 5% de las algas *Ascophyllum* y *Spirulina* incrementa las tasas de crecimiento y utilización del alimento en ejemplares de *Pagrus major* de un año de edad. También, Mustafa *et al*.(1995) evaluaron la eficacia de tres macroalgas marinas (*Ascophyllum nodosum*, *Porphyra yezoensis* y *Ulva pertusa*) utilizando el mismo nivel de inclusión en esta misma especie, y describiendo resultados similares. No obstante, existen estudios en los que se pone de manifiesto que la utilización de estos ingredientes disminuyen el crecimiento de los peces, como ocurre en los alevines de salmonete gris (*Chelon labrosus*) alimentados con piensos que contienen un 8 y 18% sobre el total del alimento biomasa de biomasa de *Porphyra purpurea* (Davies *et al*. 1997). Todo apunta a que el efecto puede variar según el tipo de alga utilizada y la especie de pez que se alimente con ella. En cualquier caso en la revisión Hasan & Chakrabarti (2009) se indica que aproximadamente entre el 10-15% de las necesidades de proteína de cada especie pueden ser sustituidas por proteína algal sin que ello comprometa el crecimiento o la utilización del alimento por parte del pez. Además parece que existe una reducción progresiva del crecimiento conforme se incrementan los niveles de microalgas en el alimento. No obstante lo anterior, en el presente estudio los ejemplares juveniles de dorada aceptaron sin problemas todos los piensos experimentales sin evidenciarse que hubiese un rechazo del alimento producido por la inclusión de la harina algal a los niveles ensayados. Además, al final del ensayo la mayoría de los peces triplicaron su peso inicial, registrándose tan solo dos bajas durante el experimento.

Los resultados obtenidos indican que el crecimiento de los juveniles de dorada no se ve afectado negativamente por la sustitución parcial de la harina de pescado por biomasa liofilizada de *Scenedesmus almeriensis*, observándose incluso una mejora significativa en el peso final de los animales alimentados con los piensos SC37. La sustitución parcial de la harina de pescado por biomasa algal ha sido realizada con éxito en diversas especies de peces como la carpa (Nandeesha *et al*. 2001), la tilapia (Isik *et al.* 1999) y la trucha arcoíris (Dallaire *et al*. 2007), además sin que ello ejerza un efecto negativo sobre el crecimiento de los animales. En el presente estudio también se pone de manifiesto que la inclusión de la harina algal no solo no ejerce un efecto negativo sobre el crecimiento de los peces sino que además, cuando el porcentaje de sustitución de la proteína de la harina de pescado es del 37,5% se incrementa el peso medio final de los peces, aunque solo con diferencias significativas respecto a los peces alimentados con SC25 y SC75. Del mismo modo, parece haber un efecto dosis-respuesta ya que los niveles de sustitución inferiores y superiores al 37% ocasionan que los peces presenten pesos medios corporales más bajos respecto a SC37, aunque sin diferencias significativas respecto al tratamiento control.

En diversos estudios se ha puesto de manifiesto que el nivel óptimo de sustitución de la harina de pescado por harina algal varía en función de la especie de microalga que se utilice. Así Olvera-Novoa *et al*. (1998) ensayaron niveles de sustitución del 20 al 80% de la proteína de origen animal por proteína de *Spirulina maxima* en piensos para tilapia (*Oreochromis mossambicus*), sin encontrar efectos negativos sobre el crecimiento hasta un 40% de sustitución. Sin embargo, estos mismos autores describieron que la menor ingesta observada para niveles de sustitución más altos fue debida a un aumento en la dureza de los gránulos, como consecuencia del mayor contenido de microalga. Por el contrario, en el presente estudio no se ha observado que se produzca una reducción en los niveles de ingesta que sean achacables a la inclusión de *S. almeriensis*. De igual modo, Kumar *et al*. (2004) utilizaron biomasa seca de la microalga *Spirogyra* en piensos para carpa (*Catla catla*), con niveles de inclusión del 10 al 40%, sin observar efectos negativos en el crecimiento. En este caso, estos últimos autores indican que los buenos resultados obtenidos son atribuibles a la abundancia de aminoácidos esenciales en esta microalga así

como a la degradación de la fibra del alimento por las bacterias presentes en el intestino de la carpa. Por su parte, en otro estudio Dallaire *et al*. (2007) utilizaron como ingrediente alternativo a la harina de pescado una mezcla obtenida a partir de las microalgas *Scenedesmus* sp., *Chlamydomonas* sp. y las cianobacterias *Lyngbya major* e *Hydrococcus rivularis* en un experimento con alevines de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), observando que la inclusión de un 12,5% de la mezcla anterior no produce efectos negativos sobre el crecimiento de los peces. No obstante, cuando se utilizaron niveles más altos de inclusión se evidenció una reducción del crecimiento de los animales como consecuencia de que tales piensos resultaron deficitarios en energía y proteína, y no satisficieron las necesidades mínimas de esta especie. En este caso, el diseño experimental del estudio tiene como principal limitación el que los piensos experimentales no fueron isoproteicos (por ejemplo, 58% de proteína cruda en el control vs un 41% en el que incluye un 50% de microalgas) e isoenergéticos, y por tanto los resultados obtenidos pudieron ser consecuencia de cualquiera de los dos factores (el nivel de algas o el desequilibro de nutrientes) o, incluso, a la interacción entre ambos. En el presente estudio y para minimizar este efecto todos los piensos experimentales fueron formulados para que resultasen isoproteicos e isoenergéticos.

Adicionalmente, en su estudio Dallaire *et al*. (2007) apuntaron que la reducción del crecimiento y de la tasa de eficiencia de la utilización del alimento, cuando el porcentaje de inclusión de microalgas es alto, puede deberse a la presencia de factores antinutritivos y/o al exceso de sales minerales, los cuales pudieron haber ocasionado un menor aprovechamiento digestivo del alimento y/o un aumento en la retención de líquidos a nivel intestinal que generaría una tasa mayor de excreción, respectivamente. Sin embargo, estos autores no presentan resultados que confirmen la primera de las hipótesis, lo que podría haberse contrastado fácilmente con la realización de un ensayo de detección de inhibidores de proteasa en los extractos acuosos preparados a partir de las harinas de microalgas.

Llegados a este punto, es preciso diferenciar claramente las dos formas distintas que se utilizan en la literatura científica para indicar el grado de inclusión de harinas de algas en

los alimentos experimentales. Por un lado i) cuando se hace referencia al nivel de inclusión de la biomasa algal en porcentaje sobre peso seco del alimento, y ii) de otro cuando se considera el porcentaje de la proteína de la harina de pescado que es reemplazada por la proteína procedente de las algas. Así, mientras en algunos trabajos (Ergün *et al*. 2009; Dallaire *et al*. 2007; Wassef *et al*. 2001) se considera el porcentaje de biomasa algal incluida en el alimento, en otros (Olvera-Novoa *et al*. 1998; Nandeesha *et al*. 1998) se tiene en cuenta el nivel de sustitución de la proteína de origen animal por proteína de origen algal. Lo anterior debe tenerse en cuenta cuando se comparan los resultados de distintos estudios, de forma que para evitar confusiones en el primero de los casos se indicará como la "inclusión" de harina algal y en el segundo como "sustitución" de la harina de pescado por harina algal. A título de ejemplo, y considerando las dos perspectivas, para el pienso SC37 el nivel de sustitución de la proteína de pescado por proteína algal es de un 37%, mientras que este valor se corresponde con un el nivel de inclusión de la biomasa algal en el pienso de un 20%. De este modo, en el presente estudio el porcentaje de inclusión de la biomasa de *S. almeriensis* más alto que se ha ensayado se corresponde con un valor cercano al 40%.

Los valores obtenidos para la tasa de crecimiento específico (SGR) fueron similares a los descritos en otros experimentos llevados a cabo con juveniles de dorada por otros autores (Sánchez Lozano *et al*. 2007; Andrew *et al*. 2004; Gomez-Requeni *et al*. 2004). También se ha descrito que la sustitución total de la harina de pescado por biomasa de *Spirulina platensis* incrementa la tasa de crecimiento específica en *Labeo rohita*, pero no así *Catla catla* (Nandeesha *et al*. 2001), lo que evidencia que el efecto parece ser especie específico. Además, en otros casos se ha descrito que la inclusión de microalgas reduce las tasas de crecimiento de los peces. Por ejemplo, Zhao *et al*. (2006) encontraron que la inclusión de un 59% de *Microcystis aeroginosa* en piensos de primera edad para alevines de carpín dorado (*Carassius auratus*) reduce el crecimiento y el valor de SGR. En general, en el presente estudio ninguno de los parámetros de aprovechamiento nutritivo se vieron afectados por la utilización de harina algal al no existir diferencias significativas respecto a los peces alimentados con el tratamiento control.

El índice hepatosomático (IHS) se utiliza para evaluar si las variaciones en la composición del alimento ocasionan un aumento o una disminución del tamaño del hígado del pez. El valor medio de IHS se redujo conforme se incrementó la inclusión de harina de microalga en el alimento. El hígado es el principal órgano implicado en el metabolismo de los peces y cualquier desequilibrio en la alimentación suele verse reflejado en este órgano como un incremento de su tamaño, debido a la acumulación de lípidos. Diversos autores han demostrado que existe una clara relación entre el porcentaje que representa la fracción hepática en el conjunto del pez y la composición química del alimento que éste ingiere. La reducción progresiva del valor de IHS en este estudio parece indicar que se produce una mayor tasa de uso metabólico y/o movilización de lípidos hepáticos conforme se incrementa el contenido en microalga en los piensos. En efecto, se ha confirmado que se incrementa el metabolismo lipídico, especialmente el de las rutas lipolíticas en peces alimentados con piensos que incluyen macro- y microalgas (Nakagawa, 1997). En concreto si se considera el perfil de ácidos grasos, Caballero *et al*. (2004) describieron que los niveles altos de 18:3n-3 en el alimento favorecen la utilización metabólica de los lípidos hepáticos en la dorada, reduciéndose el tamaño de este órgano, y por lo tanto, el valor del índice hepatosomático. Ergün *et al*. (2009) apuntaron que la inclusión de algas marinas favorece la movilización de los lípidos del alimento para ser utilizados como fuente de energía en el metabolismo del animal. Este fenómeno ha sido igualmente descrito por Piedecausa *et al*. (2007), quienes observaron que al sustituir el aceite de pescado por aceite de linaza (rico en ácido linolénico) en piensos para sargo (*Diplodus puntazo)* se reduce el valor del índice hepatósomatico respecto al de los peces alimentados con un pienso control que no incluye microalgas. En relación con esto último, uno de los ácidos grasos más abundantes en la biomasa de *S. almeriensis* es el ácido linolénico, lo cual queda reflejado en el incremento que se produce en la proporción de este ácido graso en el pienso conforme se aumenta el nivel de sustitución de la microalga, y esto a su vez también queda reflejado en los perfiles de ácidos grasos del músculo y el hígado de las doradas alimentados con estos piensos experimentales.

El balance FIFO (del inglés "*Fish-in: Fish-out ratio*") es un parámetro que se ha introducido recientemente para calcular la cantidad de pescado salvaje necesaria para producir 1kg de pescado de acuicultura (Jackson, 2009; Kaushik & Troell, 2010). En los piensos comerciales de dorada, el nivel de inclusión de harinas y aceites de pescado es del orden de 500g kg^{-1} y 150g kg^{-1}, respectivamente (Kaushik & Troell, 2010). Con los resultados obtenidos en el presente estudio, el FIFO obtenido para esta etapa del preengorde de la dorada con el pienso SC37, que contiene 395g kg^{-1} de harina de pescado y 180g kg^{-1} de aceite, es de 2,56. De este modo, con algo más de 2kg de pescado salvaje se podría obtener 1kg de biomasa de peces de preengorde en comparación con los 3,5kg de biomasa necesarios si se utiliza el pienso control. A la luz de los datos, y si la producción de *S. almeriensis* puede llevarse a cabo a un precio competitivo, es evidente que la utilización de esta microalga puede contribuir a que la producción acuícola en un futuro pueda ser una actividad más sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

Composición química de los peces

La composición proximal corporal de los juveniles de *S. aurata* no presentó diferencias significativas entre los distintos tratamientos experimentales. El contenido lipídico y proteico en la canal de los juveniles de *S. aurata* es similar al descrito por varios autores para individuos de esta especie con un mismo peso (Robaina *et al*. 1998; Ibeas *et al*. 1997, 1996). No obstante, los peces alimentados con SC37 y SC75 presentaron un mayor contenido de proteína y menor de lípidos que los peces de los demás tratamientos, aunque sin ser las diferencias estadísticamente significativas. En general, estos resultados son similares a los descritos para otras especies en los que se sustituyó la harina de pescado por harina algal (Zhao *et al*. 2006; Nandeesha *et al*. 2001; Olvera-Novoa *et al*. 1998). Sin embargo, existen numerosos experimentos en los que se modifica la composición corporal de los peces cuando se sustituye la harina de pescado por harina algal. Por ejemplo, Dallaire *et al*. (2007) y Nandeesha *et al*. (1998) comprobaron que el incremento del nivel de inclusión de harina algal disminuye la proporción de la fracción lipídica contenida en la canal de los alevines de trucha arcoíris y carpa común, y este hecho que concuerda con el

aumento de la actividad lipolítica que ocasiona el consumo de microalgas (Nakagawa, 1997). Pero este efecto parece no ser igual en todas las especies ya que la inclusión del alga *Spirogyra* incrementa significativamente el contenido graso de los tejidos de *Catla catla* (Kumar *et al*., 2004), y el uso de biomasa de *Spirulina* ejerce el mismo efecto en *C. catla* y *Labeo rohita* (Nandeesha *et al*. 2001). El hecho de que en el presente estudio no se modifique la composición proximal de los peces parece indicar que los piensos tienen una composición equilibrada, y que se produce un buen aprovechamiento del alimento con independencia de cuál sea la proporción de microalga utilizada para su preparación.

Perfil de ácidos grasos en los tejidos de los peces

De Pauw & Persoone (1988) indican que las microalgas son un elemento clave en la alimentación de numerosas especies que son cultivadas. Además, las microalgas suelen presentar un perfil sencillo de ácidos grasos que facilita su purificación, constituyendo por tanto, un recurso ilimitado que puede ser producido en cantidades industriales bajo condiciones ambientales controladas. Además, los cultivos son muy versátiles pudiéndose modificar la composición de ácidos grasos en función de la especie y medios de cultivo utilizados (Medina *et al*. 1998). Los ácidos grasos de mayor interés presentes en las microalgas son los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3, en particular EPA y DHA, por lo que resultan de gran interés como ingrediente alternativo a la harina de pescado. El contenido de ácidos grasos de las microalgas depende no solo de la especie considerada sino también de factores relacionados con las condiciones de cultivo como son la composición del medio, pH, aireación, temperatura, intensidad de luz, y edad del cultivo (Medina *et al*. 1998). En el caso concreto particular de *S. almeriensis*, el porcentaje de ácidos grasos linoleico (18:2n-6) y linolénico (18:3n-3) es 5 y 6 veces más alto, respectivamente, que en la harina de pescado. Tal y como era de esperar, los piensos experimentales que incluían biomasa de *S. almeriensis* presentaron ciertas diferencias en su composición de ácidos grasos con respecto al pienso control (que fue formulado fundamentalmente con derivados de pescado), y principalmente estuvieron caracterizados

por un incremento en la proporción de linoleico y linolénico, y una ligera reducción del contenido de EPA y DHA a medida que se incrementó el nivel de microalgas.

De este modo, el perfil de ácidos grasos de los tejidos hepático y muscular reflejó el perfil de los distintos piensos experimentales. Este un hecho ampliamente descrito en peces que la composición de ácidos grasos del alimento se refleja en la de sus propios tejidos (Benedito-Palos, 2010). Así, el mayor contenido de 18:2n-6 y 18:3n-3, y el menor de EPA y DHA, se encontró en los peces alimentados con los piensos que incluían mayor proporción de la microalga *S. almeriensis*. El análisis discriminante confirma que efectivamente se produce una separación de los distintos tratamientos en función del perfil de ácidos grasos que presenten los peces en sus tejidos, cuando se usan los datos del tejido hepático y del tejido muscular. Estos resultados concuerdan con los descritos en otros estudios en los que se pone de manifiesto que la composición de ácidos grasos de los tejidos de los peces marinos refleja la de los lípidos que ingieren con el alimento (Izquierdo *et al*. 2005; Ganuza *et al*. 2008). Así, la inclusión de harina algal dio como resultado un aumento en el porcentaje de 18:3n-3 en la fracción lipídica de los filetes de *S. aurata*. El aumento en el contenido en ácido linolénico en el filete de las doradas alimentadas con piensos con harina de *S. almeriensis* podría mejorar la calidad nutritiva del pez, ya que este ácido graso puede reducir el riesgo de infarto en un 70% (De Lorgeril *et al*. 1994, 1999). A pesar de su importancia en nutrición humana, hay pocos alimentos ricos en este ácido graso, así que su incremento en el filete de dorada podría suponer un beneficio extra en su valor nutricional cuando los peces fuesen engordados con piensos que incluyen esta microalga.

Como se ha indicado, la inclusión de harina de *S. almeriensis* dio como resultado una ligera reducción en los porcentajes de EPA y DHA en los tejidos. No obstante, en el músculo del pez la reducción de EPA fue algo más marcada que para DHA, aunque los valores prácticamente no se vieron modificados respecto al tratamiento control. Este hecho podría estar relacionado con la preferencia del uso metabólico del EPA sobre el DHA. Se ha descrito que en el músculo blanco la beta-oxidación mitocondrial se prioriza sobre la oxidación peroxisomal (Froyland *et al*. 2000). De este modo, al metabolizarse

preferentemente el EPA en las mitocondrias sobre el DHA en los peroxisomas (Madsen *et al*. 1998) se produciría cierto incremento del segundo respecto al primero en el tejido muscular.

El ligero incremento del contenido de ácidos grasos saturados en el tejido hepático podría tener relación con su uso como sustrato energético para el metabolismo general del animal. En otras especies también se ha documentado una mayor proporción de ácidos grasos saturados en este órgano (Mourente & Vázquez, 1996; Villalta *et al*. 2007, Martins *et al*. 2007, Lee & Kim, 2001, Lee & Cho, 2009, Biswas *et al*. 2009). Se ha descrito que los peces obtienen la energía para el crecimiento y el mantenimiento de su actividad metabólica sobre todo de las grasas saturadas y ácidos grasos monoinsaturados (16:0, 18:1n-9, 20:1n-9) del alimento (Ibeas *et al*. 1996; Tocher, 2003). Estos grupos de ácidos grasos son más fáciles de catabolizar vía ß-oxidación que los ácidos grasos poliinsaturados n-3 (Sargent *et al*. 2002). Adicionalmente, los procesos de lipogénesis de ácidos grasos se producen principalmente en el hígado (Bell *et al*. 1999; Martins *et al*. 2007), y los productos resultantes se suelen depositar en los tejidos en forma de triacilglicéridos (Sargent *et al*. 2002). Así, el importante papel que juega el hígado en el metabolismo lipídico del pez justificaría el citado incremento en la proporción este tipo de ácidos grasos en este tejido.

Estudio de las actividades enzimáticas digestivas

El nivel de actividad de diversas enzimas digestivas ha sido empleado como un indicador para estimar la capacidad digestiva en peces de acuicultura (Alarcón *et al.* 1998). En el presente estudio se comprueba que la utilización de *S. almeriensis* no produce ningún efecto negativo sobre las actividades enzimáticas analizadas, sino todo lo contrario ya que en algunas de ellas se incrementa significativamente el nivel de actividad respecto al grupo control (peces alimentados sin microalga). Tal es el caso de la tripsina, que es una enzima clave en los procesos de digestión de proteína y como enzima activadora de otras enzimas proteolíticas. De igual forma, las actividades aminopeptidasa y fosfatasa alcalina,

localizadas fundamentalmente en la membrana del borde en cepillo de la superficie de los enterocitos y que están implicadas en las etapas finales de hidrólisis y absorción de los nutrientes, también se incrementan significativamente con la inclusión de microalga en el alimento. Resulta evidente que la combinación de ambos efectos determina una mejor eficiencia de los procesos de digestión y absorción que tienen lugar a nivel intestinal. De este modo la mayor tasa de crecimiento observada en los juveniles de dorada cuando son alimentados con *S. almeriensis* podría estar relacionada con una mejor eficiencia en la utilización del alimento como consecuencia del incremento del nivel de actividad de algunas de las enzimas implicadas en el proceso digestivo.

Estudio de la presencia de factores antinutritivos

Otro aspecto a tener en cuenta cuando se utilizan ingredientes alternativos a la harina de pescado es la presencia de factores antinutritivos que puedan interferir con los procesos de digestión y absorción que tienen lugar en el tracto digestivo (Alarcón *et al.* 1999). Considerando el papel que tiene la proteína en la alimentación de los peces de acuicultura, los más importantes son los inhibidores de proteasas ya que tienen la capacidad de inhibir a las enzimas proteolíticas. De hecho en algunas algas marinas se ha descrito la presencia de inhibidores de tripsina y amilasa (Oliveira *et al*. 2009). No obstante, en base a los resultados obtenidos en el presente estudio se puede descartar la presencia de inhibidores de proteasa en la biomasa de *S. almeriensis* y en los piensos formulados con ella. Por un lado, en el zimograma se comprueba que los peces de todos los tratamientos presentan el mismo patrón de enzimas, y de otro, en el ensayo de inhibición *in vitro* se confirma la ausencia de inhibidores de proteasa tanto en los piensos experimentales como en la harina algal.

Estudio de la estructura histológica del hígado e intestino

Los resultados del análisis histológico de los tejidos no evidencian la existencia de alteraciones estructurales en el hígado e intestino de las doradas alimentadas con piensos que incluye *S. almeriensis*. No se pudo establecer una relación entre el contenido en la microalga *S. almeriensis* en piensos para dorada y el tamaño de los hepatocitos presentes en el tejido hepático. Sin embargo, el análisis morfométrico de las imágenes puso de manifiesto que se produce un incremento significativo de la altura de las vellosidades en el intestino distal conforme se aumenta la inclusión de harina algal. Este hecho pone de manifiesto que existe un incremento de la superficie de absorción en los tramos posteriores del intestino en los peces alimentados con *S. almeriensis*. El incremento en la longitud de las vellosidades también se ha descrito en ejemplares de sargo (*Diplodus puntazzo*) alimentados con piensos en los que se sustituyó la harina de pescado por harina de girasol (Nogales *et al*., 2010). Por su parte, Liu *et al*. (2008) incluyeron la harina de la microalga *Synechocystis* sp. y su variante transgénica, *Synechosystis* sp. PCC6803, en piensos para platija (*Paralichthys olivaceus*) sin encontrar efectos negativos en la estructura tisular del hígado e intestino. Por el contario, Atalah *et al*. (2007) incluyeron las microalgas *Crypthecodinium cohnii* y *Phaeodactylum tricornutum* en piensos de primera edad para dorada, comprobando que se produjo una degeneración local en el epitelio del intestino proximal en los peces que fueron alimentados con *P. tricornutum*, pero no con *C. cohnii*. Este fenómeno se debe a que la estructura de la cubierta externa de *P. tricornutum* presenta ornamentaciones silíceas que causan abrasión en el epitelio intestinal.

Estudio de la ultraestructura de la mucosa intestinal

Además de las actividades enzimáticas digestivas, la morfología y la estructura de la mucosa intestinal cumplen una función muy importante para el correcto desarrollo de los individuos aumentando la superficie de absorción de nutrientes y proporcionando una barrera física frente a la acción de potenciales microorganismos patógenos que circulan por la luz del tubo digestivo. En este sentido, Merrifield *et al.* (2009) describen que en

ejemplares de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) la inclusión de harina de soja provoca alteraciones en los enterocitos, disminuyendo de la longitud, grosor y densidad de las microvellosidades lo que a su vez incrementa la exposición de los enterocitos frente a los patógenos, y disminuye la eficacia del epitelio como barrera defensiva. Sin embargo, en el presente estudio se confirma que el empleo de *S. almeriensis* no ejerce efectos negativos sobre la ultraestructura de la mucosa intestinal, sino todo lo contrario. Además, en los juveniles dorada se produce un incremento tanto en la altura como en la densidad de las microvellosidades, fenómeno que determina una mejora en la contribución de la mucosa intestinal como barrera física. Por su parte, el incremento de la superficie apical de los enterocitos se puede traducir, desde una perspectiva nutricional, como un incremento en la capacidad de absorción de nutrientes a través de la mucosa intestinal. De esta manera, la utilización de biomasa de *Scenedesmus almeriensis* tiene un enorme interés aplicado en la formulación de alimentos para juveniles de dorada por los efectos beneficiosos que produce en su fisiología digestiva.

Evaluación económica de la inclusión de *S. almeriensis* en piensos para peces marinos carnívoros

Desde una perspectiva hipotética se ha realizado un análisis de costes en el que se observa cómo se produce un incremento del precio del pienso conforme se aumenta el nivel de sustitución de la harina de pescado por harina de *S. almeriensis*. Esto es debido a que el coste de la biomasa de microalga liofilizada es superior al de la harina de pescado. A pesar de esto se podrían conseguir precios de producción competitivos con niveles de sustitución de hasta un 37%, cuando se tiene en cuenta el precio de algunos de los piensos que se comercializan para peces de acuicultura marina (por ejemplo, la empresa española Acuinuga comercializa algunos piensos, de composición química similar a los utilizados en el presente estudio que también contienen microalgas, a un precio de 1,711 €/kg). No obstante, podría ser interesante en futuros trabajos realizar una evaluación económica considerando a la harina de *S. almeriensis* como un subproducto y no como el producto principal de un proceso biotecnológico. Este podría ser el caso del subproducto resultante

de la utilización de la microalga para la obtención de biodiesel por saponificación-esterificación que podría generar un ingrediente proteico con un coste menor, y que permitiría producir piensos a un precio de mercado más competitivo. En cualquier caso, y hasta que no se abaraten los costes de producción de estas microalgas, su utilización estaría limitada a las fases de cultivo larvario y/o de preengorde o para su uso en especies de alto valor económico.

Principales conclusiones

Para concluir, los resultados obtenidos permiten establecer que el nivel óptimo de sustitución de la proteína de la harina de pescado por biomasa de *S. almeriensis* en piensos para juveniles de dorada es de un 37%. Por otra parte, no se han encontrado efectos negativos sobre los parámetros zootécnicos, ni la composición proximal, ni en la estructura tisular del hígado e intestino de los juveniles de *S. aurata* cuando se emplean niveles de sustitución de hasta un 75%. Se ha observado que la inclusión de *S. almeriensis* en los piensos incrementa el nivel de ácidos grasos de la serie n-3, especialmente de linolénico, en el tejido muscular de los peces. La utilización de biomasa de *Scenedesmus almeriensis* como ingrediente alternativo a la harina de pescado no ejerce ningún efecto negativo sobre las actividades enzimáticas digestivas estudiadas en los juveniles de dorada. La inclusión de esta microalga incrementa significativamente el nivel de fosfatasa alcalina y aminopeptidasa, y este hecho es indicativo de que se produce una mejora de la eficiencia de los procesos de absorción a través de la membrana intestinal. La biomasa algal no contiene factores antinutritivos que afecten a las proteasas digestivas de los juveniles de dorada. El empleo de *Scenedesmus almeriensis*, especialmente a un nivel de sustitución del 37%, produce una mejora significativa en la integridad y en la capacidad de absorción de la mucosa intestinal en los juveniles de dorada. Por último, desde una perspectiva económica, los piensos que incluyen biomasa algal serían más caros, pero desde una perspectiva medioambiental se reduce la tasa FIFO por lo que las fórmulas resultantes serían más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido subvencionado por los proyectos Junta de Andalucía-AGR5334, MCYT-AGL2010-20052 y los fondos FEDER. Los autores agradecen especialmente a la Fundación CAJAMAR por su colaboración durante la realización de este trabajo y a la empresa Predomar S.L. por la cesión de los peces. Las instalaciones para el mantenimiento de los peces y la preparación de las dietas experimentales pertenecen al $CEIA_3$-Universidad de Almería (Servicio de Piensos Experimentales; http://www.ual.es/stecnicos_spe).

Bibliografía

Acién F.G., Fernández J.M., Magán J.J. y Molina E. (2012) Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. Biotechnology Advances 30(6), 1344-53.

Alarcón, F.J., Díaz, M., Moyano, F.J. y Abellán, E. (1998) Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). Fish Physiology and Biochemistry 19, 257–267.

Alarcón, F.J., Moyano, F.J. and Diaz, M. (1999) Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). Aquatic Living Resources 12, 233-238.

Andrew, J.E., Holm, J., Kadri, S. y Huntingford, F.A. (2004) The effect of competition on the feeding efficiency and feed handling behavior in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) held in tanks. Aquaculture 232, 317-331.

AOAC (1995) Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC International, Washington, DC.

Appler, H.N. y Jauncey, K. (1983) The utilization of a filamentous green alga (*Cladophora glomerata* (L.) Kutzin) as a protein source in pelleted feeds for Sarotherodon (*Tilapia niloticus)* fingerlings. Aquaculture 30, 21-30.

Atalah E., Hernández Cruz C.M., Izquierdo M.S., Rosenlund G. y Caballero M.J. (2007) Two microalgae *Crypthecodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricornutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture 270, 178-185.

Belarbi H., Molina E. y Chisti Y. (2000) A process for high and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. Enzyme and Microbial Technology 26, 516–29.

Bell, J.G., Tocher, D.R., Farndale, B.M., McVicar, A.H. y Sargent, J.R. (1999) Effects of essential fatty acid-deficient diets on growth, mortality, tissue histopathology and fatty acid compositions in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish Physiology and Biochemistry 20, 263-277.

Benedito-Palos, L. (2010) Sustitución de aceites de pescado en dietas de engorde para dorada (*Sparus aurata*) ricas en protetínas vegetales. Efectos sobre el crecimiento y los perfiles de ácidos grasos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 214 pp.

Benemann, J. R. (1992). Microalgae aquaculture feeds. Journal of Applied Phycology 4, 233-245.

Biswas, B.K., Ji, S.C., Biswas, A.K., Seoka, M., Kim, Y.S., Kawasaki, K-I. y Takii, K. (2009) Dietary protein and lipid requirements for the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* juvenile. Aquaculture 288, 114-119.

Borowitzka, M. A. (1997) Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. Journal of Applied Phycology 9, 393-401.

Bradford, M. (19769 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.

Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjørsvik, E., Fernández, A.J. y Rosenlund, G. (2004) Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. Journal of Fish Diseases 27, 531-541.

Cerón, M. C., Campos, I., Sánchez, J. F., Acién, F. G., Molina, E. y Fernández-Sevilla, J. M. (2008) Recovery of lutein from microalgae biomass: Development of a process for *Scenedesmus almeriensis* biomass. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, 11761–11766.

Christie, W.W. (1982) Lipid analysis. Permagon Press Canada Ltd., Toronto, Ont.

Dallaire, V., Lessard, P., Vandenberg, G. y de la Noüe J. (2007). Effect of algal incorporation on growth, survival and carcass composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. Bioresource Technology 98, 1433–1439.

Davies, S.J., Brown, M.T. y Camilleri, M. (1997) Preliminary assessment of the seaweed *orphyra purpurea* n artificial diets for thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*). Aquaculture 152, 249-258.

De Lorgeril, M., Renaud, S., Mamelle, N., Salen, P., Martin, J.L., Monjaud, I., Guidollet, J., Touboul, P. y Delaye, J. (1994) Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. Lancet 343, 1454-1459.

De Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J.L., Monjaud, I., Delaye, J. y Mamelle, N. (1999) Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. Circulation 99, 779-785.

De Pauw, N. y Persoone, G. (1988) Microalgae for aquaculture. In: Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. (Eds.). Microalgal Biotechology. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 197-221.

Ehrember, M. (1980) Microalgae: a fish faro feed for the future. Fish Farming International 7, 15-18.

El-Sayed, A.F.M. (1994) Evaluation of soybean meal, Spirulina meal and chicken offal meal as protein sources for silver seabream (*Rhabdosargus sarba*) fingerlings. Aquaculture 127, 169-176.

Ergün, S., Soyuturk, M., Guroy, B., Guroy, D. y Merrifield, D. (2009). Influence of Ulva meal on growth, feed utilization and body composition of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at two levels of dietary lipid. Aquaculture International 17, 355-361.

F.A.O. (2010) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. FAO Viale delle Terme di Caracalla, Roma, Italia, 242 p.

Froyland, L., Lie, O. y Berge, R.K. (2000) Mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation capacities in various tissues from Atlantic salmon *Salmo salar*. Aquaculture Nutrition 6, 85-89.

Ganuza, E., Benítez-Santana, T., Atalah, E., Vega-Orellana, O., Ganga, R. e Izquierdo, M.S. (2008) *Crypthecodinium cohnii* and *Schizochytrium* sp. as potential substitutes to fisheries-derived oils from seabream (*Sparus aurata*) microdiets. Aquaculture 277, 109–116.

Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S. y Pérez-Sánchez, J. (2004) Protein growth performance, amino acid utilization and

somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture 232, 439-510.

Hasan, M.R. y Chakrabarti, R. (2009) Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture: a review. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. n*o. 531. Rome, FAO. 2009. 123p.

Ibeas, C., Cejas, J., Gómez, T., Jerez, S. y Lorenzo, A. (1996) Influence of dietary n−3 highly unsaturated fatty acids levels on juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth and tissue fatty acid composition. Aquaculture 150, 91-102.

Ibeas, C., Cejas, J.R., Fores, R., Badía, P., Gómez, T. y Lorenzo Hernández A. (1997) Influence of eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid ratio (EPADHA) of dietary lipids on growth and fatty acid composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. Aquaculture 150, 91-102.

Isik, O., Sarihan, E., Kusvuran, E., Gül, Ö. y Erbatur, O. (1999) Comparison of the fatty acid composition of the freshwater fish larvae *Tilapia zillii*, the rotifer *Brachionus calyciflorus*, and the microalgae *Scenedesmus abundans*, *Monoraphidium minitum* and *Chlorella vulgaris* in the algae-rotifer-fish larvae food chains. Aquaculture 174, 299-311.

Izquierdo, M.S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Rosenlund, G. y Ginés, R. (2005) Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. Aquaculture 250, 431-444.

Jackson, A. (2009) Fish in - fish out ratios explained. Aquaculture Europe 34, 5-10.

Kaushik, S.J. y Troell, M. (2010) Taking the Fish-in Fish-out ratio a step further. Aquaculture Europe 35, 15-17.

Kumar, M., Gajaria, S.C. y Radha, K.S. (2004) Growth and development of catla (*Catla catla*) fed with different levels of diet containing *Spirogyra* sp. Bioresource Technology 95, 73–76.

Kunitz, M. (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. Journal of General Physiology 30, 291–310.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.

Lahaye, M., Gomez-Pinchetti, J.L., Rio, M.J. y García-Reina, G. (1995) Natural decoloration, composition and increase in dietary fibre content of an edible marine algae, *Ulva rigida* (Chlorophyta) grown under different nitrogen conditions. Journal of the Science of Food and Agriculture 68, 99-104.

Lee, S.M. y Cho, S.H. (2009) Influences of dietary fatty acids on growth, body composition and blood chemistry in juveniles fad cod (*Hexagrammos otakii* Jordan *et* Starks). Aquaculture Nutrition 15, 19–28.

Lee, S.M. y Kim, K.D. (2001) Effects of dietary protein and energy levels on the growth, protein utilization and body composition of juvenile masu salmon (*Oncorhynchus masou* Brevoort). Aquaculture Research 32, 39–45.

Liu, S., Zhang, X., Zang, X. y Liu, B., Arunakumara, K.K.I.U., Xu D. y Zhang, X. (2008) Growth, feed efficiency, body muscle composition, and histology of flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed GH transgenic Synechocystis. Aquaculture 277, 78-82.

Lu, J., Takeuchi, T. y Satoh, H. (2004) Ingestion and assimilation of three species of freshwater algae by larval tilapia *Oreochromis niloticus.* Aquaculture 238, 437-449.

Madsen, L., Froyland, L., Dyroy, E., Helland, K. y Berge, R.K. (1998) Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids are differently metabolized in rat liver during mitochondria and peroxisome proliferation. Journal of Lipid Research 39, 583- 593.

Martins, D., Valente, L.M.P. y Lall, S.P. (2007) Effects of dietary lipid level on growth and lipid utilization by juvenile Atlantic halibut *(H. hippoglossus* L.). Aquaculture 263, 150-158.

Medina, A.R., Grima, E.M., Jiménez, G.A. y Gónzalez, M.J. (1998) Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acid. Advanced BioTechnology 16 (3), 517-580.

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M. y Davies, S.J. (2009) Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases 32, 755–766.

Mourente, G. y Vázquez, R. (1996) Changes in the content of total lipid, lipid classes and fatty acids of developing eggs and unfed larvae of the Senegal sole, *Solea senegalensis* Kaup. Fish Physiology and Biochemistry 15, 221-235.

Muller-Feuga, A. (2000) The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. Journal of Applied Phycology 12, 527-534.

Mustafa, M.G. y Nakagawa, H. (1995) Effects of algae meal as feed additive on growth, feed efficiency, and body composition in red sea bream. Fisheries Science Tokyo 61, 25-28.

Mustafa, M.G. y Nakawaga, H. (1995) A review: dietary benefits of algae as an additive in fish feed. Badmidgeh-The Israeli Journal of Aquaculture 47, 155-162.

Mustafa, M.G., Takeda, T., Umino, T., Wakamatsu, S. y Nakagawa, H. (1994) Effects of *Ascophyllum* and *Spirulina* meal as feed additives on growth performance and feed utilization of red sea bream, *Pagrus major*. Journal Faculty of Applied Biological Science 33, 125-132.

Nakagawa, H. (1997) Effect of dietary algae on improvement of lipid metabolism in fish. Biomedicin and Pharmacotherapy 51, 345-348.

Nakagawa, H., Kasahara, S. y Sugiyama, T. (1987) Effect of Ulva meal supplementation on lipid metabolism of black sea bream, *Acanthopagrus schelegeli* (Bleeker). Aquaculture 62(2), 109-121.

Nakagawa, H., Takeda, T.A., Tetsuya, U., Mustafa, M.D.G. y Yamashita, H. (1995) Effects of feeding regime on biometric parameters and hepatic enzyme activities of young red sea bream, *Pagrus major*. Applied Biological Science, Higashi-Hiroshima 34(2), 167-178.

Nakagawa, H., Umino, T. y Tasaka, Y. (19979 Usefulness of *Ascophyllum* meal as a feed additive for red sea bream, *Pagrus major*. Aquaculture 151(1-4), 275-281.

Nandeesha, M.C., Gangadhar, B., Varghese, T.J. y Keshavanash, P. (1998) Effects on feeding spirulina platenses on the growth, proximote composition and organoleptic quality of common carp, *Ciprynus carpio*, L. Aquaculture Research 29, 305-312.

Nandeesha, M.C., Gangadhara, B., Manissery, J. K. y Venkataraman, L.V. (2001) Growth performance of two Indian major carps, catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing different levels of *Spirulina platensis*. BioresourceTechnology 80(2), 117-120.

Naylor, R.L., Goldberg, R.J., Primavera, J.H., Kaustky, N., Beveridge, M.C., Clay, J., Folk, C., Lubchenco, J., Mooney, H. y Troell, M. (2000) Effect of aquaculture on world supplies. Nature 405, 1017-1024.

Nematipour, G.R., Nakagawa, H., Nanba, K., Kasahara, S., Tsujimura, A. y Akira, A. (1987) Effect of *Chlorella* -extract supplement to diet on lipid accumulation of ayu. Nippon Suisan Gakkaishi 53, 1687-1692.

Nogales, S., Tomás-Vidal, A., Martínez-Llorens, S. y Jover-Cerdá, M. (2010) Sunflower meal as a partial substitute in juvenile sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) diets: Amino acid retention, gut and liver histology. Aquaculture 298, 275-281.

Olguín, E.J. (2012) Dual purpose microalgae bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. Biotechnology Advances. 30(5), 1031–1046.

Oliveira, M.N., Ponte-Freitas, A.L., Urano-Carvalho, A.F., Taveres-Sampaio, T.M., Farias, D.F., Alves-Teixera, D.I., Gouveia, S.T., Gomes-Pereira, J. and Castro-Catanho de Sena, M.M. (2009) Nutritive and non-nutritive attributes of washed-up seaweeds from the coast of Ceará, Brazil. Food Chemistry 11, 254-259.

Olvera-Novoa, M.A., Domínguez-Cen, I.J., Olivera Castillo, L. y Martínez-Palacios, C.A. (1998) Effects of the use of the microalga *Spirulima maxima* as fish meal replacements in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus*, Peters, fry. Aquaculture Research 29, 709-715.

Piedecausa, M.A., Mazón, M.J., García García, B., Hernández, M.D. (2006) Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). Aquaculture 263, 211-219.

Pinchetti, J.L.G., Fernández, E.C., Díez, P.M. y Reina, G.G. (1998) Nitrogen availability influences the biochemical composition and photosynthesis of tank cultivated *Ulva rigida* (Chlorophyta). Journal of Applied Phycology 10, 383-389.

Pulz, O. y Gross, W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology 65, 635-648.

Rico, R.M. (2012) Efecto fisiológico y microbiológico del uso de algas en la alimentación de peces como sustitutivo de harina de pescado. Hacia una acuicultura sostenible. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga, España. 201 p.

Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero D. (1998) Increase of the dietary *n*−3/*n*−6 fatty acid ratio and addition of phosphorus improves liver histological alterations

induced by feeding diets containing soybean meal to gilthead seabream, *Sparus aurata.* Aquaculture 161, 281-293.

Robin, J.H. y Vincent, B. (2003) Microparticulate diets as first food for gilthead sea bream larva (*Sparus aurata*): study of fatty acid incorporation. Aquaculture 225(1-4), 463-474.

Rodríguez-Ruiz, J., Belarbi, E. H., García, J. L. y López, D. (1998) Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. Biotechnology Techniques 12, 689–691.

Sánchez Fernández, J.F. (2008) Caracterización de la nueva microalga *Scenedesmus almeriensis*. Producción en fotobiorreactores internos y externos. Tesis Doctoral. Universidad de Almería, España. 165 p.

Sánchez-Lozano, N., Vidal, A.T., Martínez-Llorens, S., Nogales-Mérida, S., Espert-Blanco, J., Moñino-López, A., Pla-Torres, M. y Jover-Cerdá, M. (2007) Growth and economic profit of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed sunflower meal. Aquaculture 272, 528-534.

Sargent, J.R., Tocher, D.R. y Bell, J.G. (2002) The lipids. En: Fish Nutrition, Third Edition. Editado por Halver, J.E. y Hardy, R.W. Academic Press, New York, pp: 181-257.

Satoh, K.I., Nakagawa, H. y Kasahara, S. (1987) Effect of Ulva meal supplementation on disease resistance of red sea bream. Nippon Suisan Gakkaishi 53(7), 1115-1120.

Silva, F.C.P., Nicoli, J.R., Zambonino-Infante, J. L., Le Gall, M.M., Kaushik, S. y Gatesoupe, F.G. (2010) Influence of partial substitution of dietary fish meal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream, *Sparus aurata* and goldfish, *Carassius auratus*. Aquaculture, 306(1-4), 233-237.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. e Isambert, A. (2006) Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering 101 (2), 87–96.

Tacon, A.G.J. y Forster, I.P. (2003) Aquafeeds and the environment: Policy implications. Aquaculture 226, 181-189.

Tocher, D.R. (2003) Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Reviews in Fisheries Science 11, 107-184.

Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P y Bell, J.G. (2007) Effects of dietary eicosapentaenoic acid on growth, survival, pigmentation and fatty acid composition in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. Aquaculture Nutrition 13, 1-10.

Volpe, J.P. (2005) Dollars without sense: The bait for big-money tuna ranching around the world. BioScience 55(4), 301-302.

Walter, H.E. (1984) Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. En: Methods of Enzymatic Analysis. Vol. V, pp. 270–277. Edited by H. J. Bergmeyer. Verlag Chemie, Weinham.

Wassef, E.A., El-Masry, M.H. y Mikhail, F.R. (2001) Growth enhancement and muscle structure of striped mullet, *Mugil cephalus* L., fingerlings by feeding algal meal-based diets. Aquaculture Research 32, 315-322.

Yamaguchi, K. (1997) Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. Journal of Applied Phycology 8, 487-502.

Zhao, M., Xie, S., Zhe, X., Yang, Y., Gan, L. y Song, L. (2006) Effect of inclusion of blue-gree algae meal on growth and accumulation of microcystins in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). Journal of Applied Ichthyology 22, 72-78.