


WP3. NUTRICIÓN Y BIENESTAR (NUBE)

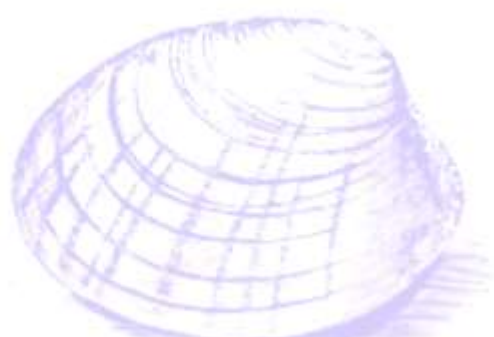
Responsables:

- Juan Carlos Navarro

Grupos participantes:



| GRUPO | IP1 | IP2 |
|-------|-----------------------------|--------------------------|
| CSIC1 | Jaume Pérez Sánchez | Josep Calduch Giner |
| CSIC6 | Fidel Toldrá Vilardell | Leticia Mora Soler |
| CSIC7 | José Miguel Cerdá Reverter | Esther Leal Cebrián |
| CSIC8 | Juan Carlos Navarro Tárrega | |
| UA3 | Carlos Sanz Lázaro | Ana Beltrán Sanahuja |
| UPV5 | José Manuel Barat Baviera | Isabel Fernández Segovia |
| UPV9 | Miguel Jover Cerdá | David Sánchez Peñaranda |



Objetivos Específicos y Conexión con las líneas de actuación del plan nacional

Objetivo 3.1. Mejorar el conocimiento sobre el bienestar de los cultivos mediante el uso de nuevas herramientas e indicadores de bienestar en un contexto de cambio global.

Actuación A2.11: Mejora del conocimiento sobre el bienestar de los cultivos y desarrollo de sistemas que permitan monitorizar, de modo continuo y fiable:

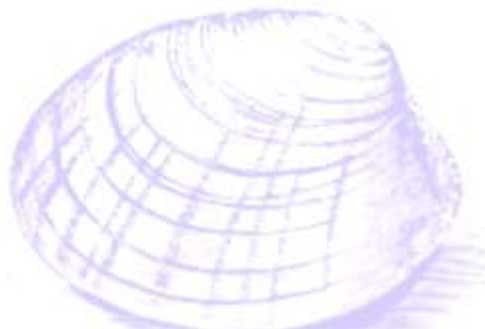
- I. Nuevos indicadores de bienestar en condiciones normales de cultivo y durante el proceso de sacrificio (cuando corresponda)
- II. Desarrollo de estrategias para mejorar la ingesta y el aprovechamiento del alimento, el crecimiento, la reproducción y el estado de salud (susceptibilidad a enfermedades) de los ejemplares cultivados.

Objetivo 3.2 (A2.12). Mejorar la nutrición y alimentación de animales en cultivo mediante el uso de nuevas formulaciones de piensos basadas en mezclas de materias primas alternativas y suplementos dietéticos validados a lo largo del ciclo de producción con datos zootécnicos, de comportamiento y nuevas herramientas de biología molecular y de monitorización de la microbiota.

Actuación A2.12: Mejora de la nutrición y alimentación de peces mediante el uso de nuevas formulaciones de piensos basadas en mezclas de materias primas alternativas (proteínas de insectos, poliquetos, extractos de algas, levaduras, proteínas bacterianas, etc.) y suplementos dietéticos (probióticos, prebióticos, simbióticos, probióticos), validados a lo largo del ciclo de producción con datos zootécnicos, de comportamiento (ingesta, actividad física, ocupación del espacio, etc.) y nuevas herramientas de biología molecular y de monitorización de la microbiota como marcador del estado general del pez.

Objetivo 3.3 (A2.13). Generación de nuevos ingredientes para piensos de acuicultura a partir de la valorización de descartes de la pesca y otros productos y subproductos de origen vegetal o animal con el fin obtener compuestos de interés para la salud y la nutrición de las especies cultivadas.

Actuación A2.13: Generación de nuevos ingredientes para piensos de acuicultura a partir de la valorización de descartes de la pesca y otros subproductos de origen vegetal o animal con el fin obtener mediante la aplicación de herramientas biotecnológicas compuestos de interés para la salud y la nutrición de las especies cultivadas.



Descripción de tareas

Con indicación de Objetivos relacionados, fechas de ejecución y Grupos de Investigación que participan en la Tarea propuesta

Objetivo 3.1

Tarea 3.1.1 (M1-M36) - Comportamiento y microbiota – Estandarización de la monitorización de parámetros de comportamiento y de la microbiota de piel e intestino para una mejor evaluación y adecuación del estado nutricional y de bienestar de peces en cultivo. Para la evaluación del comportamiento se utilizarán nuevas versiones de data-loggers (AEFishBIT v3) implantados en el pez para el registro con un alto nivel de resolución de la actividad física, la frecuencia respiratoria y la trayectoria espacial durante varios días (1-7 días). El dispositivo, desarrollado en el proyecto europeo AQUAEXCEL²⁰²⁰, está protegido por patente. Para el análisis de muestras de microbiota se evaluará la conveniencia de diferentes plataformas de secuenciación (Illumina, PacBIO, Oxford Nanopore) en base a criterios de coste, precisión e inmediatez de resultados. También se analizarán muestras de agua (ADN ambiental) para evaluar mediante técnicas de “metabarcoding” la abundancia de organismos en el medio de cultivo, así como el efecto de factores bióticos y abióticos sobre la presencia en el medio de ADN de la especie cultivada como indicador de biomasa, erosiones dérmicas y estado general de la población en cultivo.

Responsable: CSIC1

Resultado: Se han utilizado bio-loggers (acelerómetro triaxial, FishBIT) implantados en el opérculo para monitorear la actividad física y frecuencia respiratoria de peces en cultivo. El dispositivo, protegido por patente (ES2725913A1 y EP3779849), ha mejorado sus prestaciones gracias a un nuevo software que permite la toma de datos a intervalos variables, estando en fase de desarrollo una nueva versión con mayor autonomía de funcionamiento, comunicación inalámbrica y una app de móvil para la programación y recuperación de datos. El sistema de anclaje se ha adaptado al tamaño y nivel de osificación del opérculo de la especie en estudio (dorada, lubina, trucha y salmón), permitiendo iniciar la toma de datos rápidamente tras la implantación del dispositivo (2,5-7 h). Las ventajas de su pequeño tamaño y alta frecuencia de registro se documentan en un artículo de revisión (Calduch-Giner et al., 2022), habiéndose demostrando su utilidad en estudios de comportamiento/interacción social y adaptación a altas densidad de cultivo. Se ha completado la estandarización de tecnologías de secuenciación de tercera generación (Nanopore; MinION, PromethION) para la monitorización “in house” y a bajo coste de la microbiota del agua y de muestras de heces y mucosas (branquias, piel, intestino) de peces en cultivo mediante técnicas de 16S metabarcoding. La elección de cebadores, condiciones del PCR, modelos de basecalling y modo de preparación de las librerías de secuenciación está supeditado al tipo y calidad de la muestra (degradación ADN microbiano, contaminación por ADN del huésped, etc). En paralelo, se han utilizado de forma combinada las plataformas de Illumina y Nanopore para identificar marcadores microbianos de estrés térmico y exposición a microfibras sintéticas, además de estudiar los efectos de diferentes tipos de aditivos sobre la microbiota según el genotipo del hospedador.

Impacto: Se han desarrollado y validado nuevas herramientas de monitorización rápida y poco invasiva del comportamiento de peces y de los microorganismos que forman parte de los sistemas de cultivo. El dispositivo FishBIT ha sido incluido en el Catálogo CSIC 2024 de tecnologías con mayor potencial comercial. Se han publicado 5 artículos y otros 2 están en fase de revisión. Los resultados obtenidos forman parte de una tesis doctoral internacional ya finalizada (Fernando Naya-Català, 2024) y otra en curso (Ricardo-Domingo Bretón).

Tarea 3.1.2 (M1-M40) - Cortisol dérmico – Validación del uso de medidas de cortisol en escamas como indicadores de estrés crónico en especies mediterráneas (dorada, lubina, seriola y corvina) en cultivo. Se desarrollarán métodos para la determinación inmunoenzimática de cortisol que serán validados para los

plasmas de las diferentes especies objetivo. Se validarán métodos químicos de extracción de la hormona a partir de las matrices tisulares mediante la utilización de diferentes solventes orgánicos, analizando los extractos obtenidos en ensayos de paralelismo. Se estudiará la zonación de acumulación hormonal en escamas y/o cartílago proveniente de diferentes regiones de la anatomía del animal y mediante experimentos de estrés crónico se validará el efecto de este sobre la acumulación de hormona en las zonas más críticas de las diferentes especies. Además, se realizarán comparaciones del nivel de acumulación con animales salvajes de talla similar. Una vez desarrollados estos métodos y validada la acumulación hormonal dependiente del estrés se estudiará la acumulación de cortisol durante el ciclo vital hasta la obtención de la talla comercial, así como el efecto de la densidad de cultivo de animales y variaciones de los parámetros ambientales sobre la dinámica de acumulación.

Responsable: CSIC7

Colaboradores: CSIC3, UV1, UV4, UJ12

Resultado: Se han desarrollado y validado métodos de extracción y de determinación inmunoenzimática de cortisol en diferentes matrices tisulares. Se ha demostrado que tanto las escamas dérmicas como las aletas, pectoral y caudal, acumulan cortisol en función del estrés crónico en tres especies estudiadas: dorada, lubina y corvina, sugiriendo su potencial utilización como indicadores del estrés crónico. Adicionalmente, y en colaboración con WP1; UV4 se ha profundizado en la caracterización de nuevos indicadores de estrés crónico en escamas mediante estudios metabolómicos en dorada y corvina. Los estudios “long range” de índole comparativa han llevado a la caracterización de rutas metabólicas afectadas de forma diferencial por el estrés crónico. En colaboración con WP1; UV4 se ha iniciado estudio de las rutas sintéticas de glucocorticoides en las escamas y aletas de dorada y corvina mediante técnicas metabolómicas. En colaboración con WP4; UV1 se ha firmado un convenio para el estudio del efecto de aditivos alimenticios sobre el crecimiento y la respuesta a patógenos bacterianos en la lubina. En dicho estudio también participa WP4; CSIC3. Fruto de las colaboraciones con UJ12, se ha obtenido financiación del programa Prometeo de la GV, para la integración de parámetros comportamentales en modelos predictivos desarrollados para jaulas marinas de corvina [Advances in Robotics and Marine Intervention Technology: Applications in Aquaculture (ARTEMISA) (CIPROM2023/47)]

Grado de consecución: 90%

Impacto: Se ha logrado desarrollar y validar métodos de extracción y determinación inmunoenzimática de cortisol en tejidos, mostrando que las escamas y aletas de especies como dorada, lubina y corvina acumulan cortisol en respuesta al estrés crónico, lo que las convierte en indicadores útiles de este tipo de estrés. Además, se han identificado rutas metabólicas afectadas por el estrés a través de estudios metabolómicos, y se están investigando las rutas sintéticas de glucocorticoides. Los resultados obtenidos forman parte de una tesis doctoral internacional ya finalizada (Alejandra Godino, 2024)

Tarea 3.1.3 (M3-M45) - Seguimiento del perfil de ácidos grasos – Se aplicará un método de predicción y seguimiento del perfil de ácidos grasos de peces de acuicultura basado en el análisis de las escamas que se encuentra en la actualidad en proceso de estudio de patentabilidad. El método permite hacer el seguimiento de los perfiles de ácidos grasos durante el ciclo productivo de peces como la lubina, la dorada, la corvina, etc... Se aplicará en aquellos escenarios experimentales que impliquen un efecto de la dieta sobre la composición final del pez (efectos de piensos de sustitución), y durante el proceso de maduración y puesta (control de reproductores) para monitorizar el efecto de las dietas de maduración y los posibles eventos de movilización de ácidos grasos esenciales a lo largo del periodo de puesta. El seguimiento de los perfiles de ácidos grasos esenciales permitirá asimismo complementar el control del bienestar animal junto a las metodologías “ad hoc”. En su caso, la metodología permitirá asimismo la trazabilidad del producto final en tareas de control de calidad y detección de fraudes.

Responsable: CSIC8

Participantes: CSIC1

Resultado: Se ha desarrollado un método rápido, no invasivo e incruento para predecir el perfil de ácidos grasos en el músculo de peces sin necesidad de sacrificarlos. Se basa en el análisis rápido de los perfiles

de ácidos grasos de las escamas de peces y en el paralelismo de los mismos con el del músculo. El procedimiento está puesto a punto y bajo protección. El procedimiento, inicialmente patentado (Navarro, J.C., Varó, I., Hontoria, F., Monroig, O. (2022). Procedimiento no invasivo para predecir el perfil de ácidos grasos en músculos de peces (España núm. de patente: 202231056) está actualmente protegido como Secreto Industrial. Adicionalmente, se ha puesto a punto un método rápido de fraccionamiento de los lípidos totales mediante extracción en fase sólida, para el estudio de los perfiles de ácidos grasos de las grandes clases de lípidos. Aplicando esta última metodología, se ha iniciado el análisis de muestras de los estudios involucrados en la tarea 3.3.2. En coordinación con la Tarea 2.1.4 (WP2; CSIC2), se ha estudiado el efecto de la maduración sobre la calidad en ácidos grasos del filete de lubinas en cultivo, teniendo en cuenta tanto el sexo de los animales como el grado de madurez. Así, se han determinado los ácidos grasos de filetes provenientes de ejemplares de lubina en distinto grado de madurez sexual, integrando los datos en modelos quimiométricos. A partir del engorde de dorada, llevado a cabo dentro de la tarea 3.2.1, se han obtenido muestras de escamas de peces de tamaño comercial (800-900 g) alimentados desde los primeros estadios (10-15 g) con dietas experimentales de diferente contenido en harinas y aceites de pescado. Las muestras así obtenidas podrán utilizarse para la validación del método de predicción de la composición de ácidos grasos del filete.

Grado de consecución: 75%

Impacto: Se ha generado un método rápido, no invasivo y sin sacrificio para predecir el perfil de ácidos grasos en el músculo de peces, lo que contribuye a la mejora de la sostenibilidad y eficiencia en la acuicultura. Este avance, permite evaluar de modo incruento la calidad del pescado en función de su dieta y maduración, con aplicaciones en la mejora de la calidad de los productos acuícolas. Se dispone de muestras para avanzar en la validación del método dentro de otras tareas del proyecto.

Tarea 3.1.4 (M6-M45) - Herramientas de análisis computacional y de integración omica – Se desarrollarán y evaluarán modelos y simuladores de sistemas virtuales para explorar diferentes escenarios evolutivos que permitan maximizar la probabilidad de éxito de los cultivos en un contexto de cambio climático. El sistema integrará parámetros de monitorización ambiental y animal (individuales y poblacionales) generados en el proyecto ThinkInAzul y en otros proyectos europeos del H2020 (PerformFISH, GAIN, AquaIMPACT, AQUAEXCEL²⁰²⁰, AQUAEXCEL3.0, EATFISH) y del Horizonte Europa (AQUASERV), en los que ha participado/participa activamente el grupo CSIC1.

Responsable: CSIC1

Colaboración: CSIC3

Resultado: Se ha desarrollado SAMBA (Structure-Learning of Aquaculture Microbiomes Using a Bayesian Approach), una herramienta bioinformática basada en Redes Bayesianas para integrar parámetros de monitorización ambiental y animal en peces de cultivo. Los modelos generados permiten crear escenarios virtuales para predecir la evolución de los sistemas de cultivo e identificar las condiciones óptimas para su éxito. Entrenada y validada con datos de microbiomas de más de 50 experimentos, SAMBA relaciona cambios en la microbiota con variables bióticas (especie, genética, etc.) y abióticas (temperatura, oxígeno, etc.), lo que permite establecer relaciones causales entre diferentes taxones microbianos, muy influenciadas por el sistema de cultivo, la genética y la dieta. SAMBA también contempla la integración de otras omicas como un sistema probabilístico de integración multi-ómica, ya testado para la integración de datos metagenómicos y del transcriptoma del hospedador. Así, SAMBA se presenta como una herramienta de meta-análisis capaz de definir cómo diferentes factores modulan el microbioma, y de identificar las condiciones experimentales óptimas para obtener un pan-microbioma determinado, a la vez que establecer las relaciones causales existentes entre los diferentes taxones microbianos. En paralelo, y dentro del marco Programa Momentum del CSIC (atracción, formación y retención de talento digital) se están desarrollando otros modelos computacionales que contemplan el establecimiento de una serie de reglas y ordenes jerárquicas de acuerdo con los principios de “membrane computing”, para predecir y modular la evolución de la interacción microbiota x hospedador en un contexto de cambio climático.

Grado de consecución: 80%

Impacto: Se han desarrollado nuevas herramientas bioinformáticas que están contribuyendo activamente a la definición de determinados patrones de microbiota como nuevos biomarcadores de bienestar. En esta línea, se ha promovido como “convenor/chair” las sesiones de Microbiota en los últimos Congresos Internacionales de Acuicultura (Aquacultura Europe 2023, Viena; Aquaculture Europe 2024, Copenhague). Se ha finalizado una tesis doctoral industrial (Beatriz Soriano, 2023), se han publicado dos artículos y otros dos están en preparación.

Tarea 3.1.5 (M24-M42) - El interactoma del bienestar de peces en cultivo. Edad biológica y programación nutricional – Se aplicarán diferentes metodologías para evaluar directa o indirectamente la edad biológica, definida como un determinado estado estructural y funcional del organismo a lo largo del tiempo, que modula la capacidad del individuo para interactuar de forma adecuada con el medio y sus congéneres. La hipótesis de partida es que el aumento de las desviaciones de la edad biológica con respecto a la cronológica es indicativo de algún tipo de anomalía y/o disfunción. No existe una metodología precisa para evaluar la edad biológica en un sistema de producción acuícola, por lo que se han planteado diferentes aproximaciones a nivel global y celular/molecular, que incluyen cambios en la proporción de sexos y/o en el patrón de expresión/metilación génica. A nivel celular, se utilizará una metodología similar para evaluar la eficacia de la nutrición parental para mejorar la calidad/bienestar de la progenie.

Responsable: CSIC1

Colaboradores: CSIC2, CSIC3

Resultado: Se ha integrado el estudio del transcriptoma y epigenoma, junto con el análisis de la proporción de sexos, para evaluar alteraciones fisiológicas como indicadores del bienestar de peces en cultivo a lo largo de su ciclo biológico. Cada método presenta sus ventajas e inconvenientes, y en el caso de un pez hermafrodita protándrico como la dorada, la aceleración de la reversión sexual de macho a hembra con un perfil esteroideo masculinizado se ha propuesto como un indicador retrospectivo de alteraciones de la función/capacidad reproductiva en respuesta a una dieta, manejo y/o genética inadecuada de los animales. A nivel celular, tras un primer screening de varios tejidos, la atención se ha centrado en la búsqueda de marcadores musculares de carácter multifuncional con un patrón de expresión y de metilación (región reguladora) diferencial con la edad. Tras un filtrado masivo de datos de RNA-seq y Metil-seq, se han identificado 10 genes candidatos como marcadores de edad cronológica y biológica, altamente relacionados con el metabolismo lipídico. El uso de estos genes como marcadores de edad biológica se está validando mediante PCR-array en muestras de peces sometidos a diferentes niveles de estrés ambiental (densidad de cultivo) y nutricional (diferentes formulaciones de piensos con fuentes alternativas de proteína). Asimismo, se ha demostrado que, en respuesta a una diferente nutrición parental, la progenie de familias seleccionadas por rápido crecimiento muestran un determinado patrón de expresión y metilación hepática que facilita su adaptación a nuevas formulaciones de piensos.

Grado de consecución: 85%

Impacto: Los resultados obtenidos contribuyen a la comprensión y mejora del bienestar y manejo de peces en cultivo, abordando específicamente el uso de biomarcadores de edad biológica y programación nutricional para optimizar los sistemas de producción en acuicultura. Se han publicado 4 artículos. Estos resultados son parte de la tesis doctoral internacional ya finalizada de Fernando Naya-Català.

Objetivo 3.2

Tarea 3.2.1 (M3-M40) - Nuevas formulaciones de piensos de dorada – Se evaluará a escala piloto la viabilidad de nuevas formulaciones de piensos de engorde de peces (Aquafeed Technology 3.0) con diferentes combinaciones de proteínas vegetales, proteínas de insectos, proteínas unicelulares de bacterias y levaduras, hidrolizados proteicos, aditivos y productos de descarte de acuicultura a lo largo de todo el ciclo de producción. La recogida de parámetros zootécnicos se complementará con tests de estrés ambiental (confinamiento, baja disponibilidad de oxígeno, alta temperatura, etc.) para evaluar los efectos de la dieta sobre la fisiología y robustez de los animales en un contexto de cambio global. Como

indicadores de bienestar se utilizará una amplia gama de marcadores bioquímicos (GH, IGFs, glucosa, lactato, TG, capacidad antioxidante, etc.), moleculares (PCR-array, RNA-seq) y epigenéticos (metilación-DNA), además de los ya mencionados de microbiota, ADN ambiental, comportamiento y ácidos grasos y cortisol dérmicos (Tareas 3.1-3.3).

Responsable: CSIC1

Participantes: CSIC7, CSIC8

Colaboradores: CSIC2, UPV4, UMH1, UJI1

Resultado: Durante un ciclo de engorde de 24 meses (mayo 2022 - abril 2024), se evaluó el uso de una dieta control frente a dos formulaciones alternativas de alto contenido en proteínas animales (PAP) y proteínas unicelulares y de insectos (ALT). El engorde comenzó con juveniles de 8-10 g y continuó hasta alcanzar la primera madurez sexual en un porcentaje significativo de hembras. Los peces fueron alimentados con comederos automáticos 1-3 veces al día (3-5 días a la semana) según las tablas de ración y el comportamiento observado. A lo largo de todo el engorde, los peces se mantuvieron en condiciones de circuito abierto y fotoperiodo/temperaturas naturales con una densidad máxima de cultivo de 25 kg/m³ y [O₂] > 75% de saturación. De forma periódica se hicieron muestreos de biomasa y se tomaron muestras de agua, sangre y tejidos para análisis bioquímicos, de expresión génica, y del microbioma de agua, heces, piel e intestino. Todos los grupos mostraron un crecimiento rápido y con una alta tasa de conversión del alimento sin daño histopatológico en hígado e intestino. Por el contrario, se detectaron cambios a nivel transcripcional que muestran la convergencia temporal del transcriptoma hepático y muscular de los grupos CTRL y ALT que se observa en intestino y riñón anterior. A nivel metagenómico, están completados los análisis de muestras de agua e intestino, habiéndose observado que el transcriptoma intestinal del huésped acaba anticipándose a los cambios del microbioma intestinal. A nivel bioquímico destacan los niveles bajos de cortisol en los peces del grupo ALT, lo que está asociado a un comportamiento más reactivo en tests de confinamiento. Las muestras para la evaluación de los efectos de la dieta sobre la capacidad reproductiva (WP2; UPV4, CSIC2) y calidad y seguridad alimentaria (WP5; UMH1, UJI1) ya han sido generadas para su estudio y procesado.

Grado de consecución: 90%

Impacto: Los resultados contribuyen a un enfoque más sostenible y eficaz en la acuicultura, alineado con las necesidades de la industria para mejorar la producción y reducir su impacto ambiental, particularmente en lo que se refiere a innovación de dietas de engorde, optimización de las condiciones de cultivo e interacción nutrición x genética x microbiota. Tesis doctoral en curso (Ricardo Domingo-Bretón)

Tarea 3.2.2. (M1-M45) - Desarrollo de piensos sostenibles para camarón – Tras la optimización del biofloc utilizando diferentes salinidades, densidades y la adición de diferentes estimulantes de las poblaciones bacterianas (prebióticos, probióticos y simbióticos), se evaluará la digestibilidad y biodisponibilidad de los posibles ingredientes alternativos que se caracterizan por su alta sostenibilidad (subproductos de la industria agroalimentaria, productos transformados o materias primas ecológicas). Gracias a los datos obtenidos de digestibilidad y biodisponibilidad, se formularán diferentes piensos con altos niveles de sustitución de la harina de pescado, en algunos casos incluyendo aditivos, para comprobar su efecto en la calidad nutricional, sensorial y la salud del camarón (fisiología del tracto intestinal: microbiota, histología, etc...). Finalmente, las combinaciones que proporcionaron los mejores resultados (2 grupos experimentales) se escalarán en tanques de gran tamaño (4 m³), similares a condiciones comerciales, potenciando la transferencia de los resultados a la empresa privada.

Responsable: UPV9

Participantes: CSIC6

Resultado: Se ha llevado a cabo un ensayo de tasas de alimentación al objeto de adaptar las raciones a las particularidades del sistema biofloc. Para ello se procedió a alimentar camarones con una tasa de alimentación diaria (TAD) de 50, 60, 70, 80, 90 y 100% de las recomendaciones genéricas para la especie. Tras 125 días de ensayo, la TAD 80% fue considerada óptima. Asimismo, se han realizado pruebas

preliminares para determinar el marcador más apropiado para los ensayos de digestibilidad, resultando que el Y_2O_3 es el más adecuado. Se han realizado dos pruebas de crecimiento con ingredientes vegetales ecológicos, soja, trigo y guisante, con camarones de 4 y 12 g, y no se obtuvieron diferencias significativas en el crecimiento. Se ha estudiado la digestibilidad de los piensos y se llevó a cabo un análisis organoléptico de los camarones. El análisis del microbiota intestinal está en marcha. En la actualidad se está llevando a cabo un ensayo con piensos a base de ingredientes animales ecológicos, subproductos de cerdo ibérico, carcasa y vísceras de pollo y subproducto de trucha, todos ellos sin harina de pescado, frente a un control con 12% harina de pescado. Tras 60 días de ensayo, solo aparecen diferencias significativas en el pienso con vísceras de pollo. Asimismo, se está realizando un ensayo de digestibilidad de los piensos con ingredientes animales. También se han desarrollado varias pruebas para evaluar la fermentación de ingredientes vegetales, soja y girasol, con *Bacillus subtilis*, y mejorar el perfil de aminoácidos esenciales. de momento se ha conseguido una mejora del nivel proteína de un 5% en la soja fermentada. Finalmente, se están planificando ensayos de hidrólisis de los subproductos animales para su incorporación a los piensos experimentales. Así, en colaboración con CSIC6, Se ha llevado a cabo un ensayo de digestibilidad con carcasa de pollo sometida a dos procesos de hidrólisis, y se está planificando un ensayo de crecimiento.

Grado de consecución: 60%

Impacto: Se ha optimizado la tasa de alimentación en camarones en un sistema biofloc, estableciendo la tasa de alimentación diaria del 80% como la ideal. Se han realizado pruebas de piensos elaborados con ingredientes ecológicos vegetales y animales, sin diferencias significativas en crecimiento. Se ha mejorado la digestibilidad y el perfil de aminoácidos de la soja fermentada, y se están evaluando subproductos animales para piensos.

Tarea 3.2.3. (M3-M45) - Metabolismo lipídico – Se estudiará el metabolismo lipídico de organismos acuáticos de interés en acuicultura alimentados con diferentes formulaciones para su uso como producto final. Se abordará el estudio de los mecanismos moleculares que explican la biosíntesis de lípidos fisiológicamente esenciales, como LC-PUFAs y VLC-PUFAs, en animales acuáticos objeto de acuicultura, mediante el desarrollo de herramientas efectivas que permitan identificar sus requerimientos y poder así, entre otras cosas, formular óptimamente las dietas que satisfagan tales requerimientos. Se explorarán estrategias de alimentación que ayuden a optimizar la biosíntesis de LC-PUFAs en organismos objeto de cultivo, mediante la caracterización del repertorio de genes desaturasa y elongasa implicados en la biosíntesis de LC-PUFAs, la activación de las vías biosintéticas en condiciones de cultivo optimizadas, y la evaluación de la suplementación de la dieta con potenciadores eficaces de la biosíntesis de LC-PUFAs.

Responsable: CSIC8

Participantes: CSIC1

Resultado: Se ha contribuido al estudio del repertorio de genes que codifican las enzimas implicadas en el metabolismo lipídico de invertebrados: elongasas y desaturasas “front-end” y “methyl-end”, con especial énfasis en los anélidos, pero también en crustáceos. En anélidos se han caracterizado las funciones de las enzimas codificadas en especies representativas seleccionadas, demostrando que se ha producido una amplia diversificación funcional durante su expansión en ecosistemas tanto terrestres como acuáticos. Los resultados apuntan hacia el hecho de que los anélidos poseen el equipo enzimático necesario para convertir los precursores de C18 en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) fisiológicamente relevantes, tales como los ácidos eicosapentaenoicos (EPA) y araquidónico (ARA), pero no el ácido docosahexaenoico (DHA). Algunos crustáceos como los copépodos harpacticoides pueden sintetizar EPA y ARA, pero también de DHA. Se están llevando a cabo estudios similares en crustáceos caprélidos dado que se han reportado niveles elevados de LC-PUFA en estos organismos en la literatura científica. Además, se está trabajando en el estudio de los efectos de plásticos biodegradables de polihidroxibutirato-co-valerato, en el perfil de ácidos grasos de invertebrados, utilizando el microcrustáceo *Artemia* como modelo. Finalmente, se han aplicado las metodologías desarrolladas al estudio del metabolismo lipídico de vertebrados, en este caso peces Osmeriformes, demostrando que

Plecoglossus altivelis posee la capacidad enzimática completa para sintetizar LC-PUFA a partir de sus precursores de 18 carbonos.

Grado de consecución: 80%

Impacto: Se ha ampliado el conocimiento sobre el metabolismo lipídico en invertebrados, destacando la capacidad de anélidos y crustáceos para sintetizar ácidos grasos esenciales. Se está investigando el impacto de plásticos biodegradables en el perfil lipídico de invertebrados. Además, los hallazgos sobre la capacidad enzimática de ciertos peces para sintetizar LC-PUFA abren nuevas oportunidades en acuicultura y ecología.

Tarea 3.2.4. (M12-M45) -Caracterizar los efectos paliativos de la inclusión de probióticos dietarios sobre el estrés crónico y el bienestar animal en cultivo de especies mediterráneas (dorada, lubina, corvina, seriola) – Tanto *Lactobacillus rhamnosus* como *Bifidobacterium longum* reducen la ansiedad en el pez cebra regulando la respuesta de los animales al estrés. La hipótesis de partida es que la modulación de la microbiota mediante la administración de probióticos puede reducir el estrés crónico en las especies de cultivo. Esta hipótesis llevará a desarrollar experimentos en los que animales sometidos a un estrés crónico sean alimentados con suplementos probióticos. Utilizando los métodos desarrollados anteriormente y los conceptos alcanzados se compararán los valores de acumulación de hormonas y/o metabolitos en las estructuras objetivo con los de animales sometidos al mismo protocolo de estrés, alimentados con el mismo pienso, pero sin suplemento de probióticos. El efecto de los probióticos se valorará también sobre grupos de animales a los que no se aplica el protocolo de estrés.

Responsable: CSIC7

Resultado: El desarrollo del experimento se vio impedido por la infección de los animales experimentales debido a un proceso de linfocistis. Actualmente, se han obtenido nuevos animales para el desarrollo de la experimentación, y se han formulado los piensos pertinentes en colaboración con de la empresa "Life Bioencapsulación". Los piensos serán manufacturados en función de del desarrollo de los experimentos para los cuales son necesarias unas condiciones ambientales optimas (temperatura y fotoperiodo).

Grado de consecución: 40%

Impacto: Se han formulado piensos con probióticos para realizar ensayos de estrés.

Objetivo 3.3

Tarea 3.3.1. (M1-M42) - Valorizar descartes y subproductos de las industrias pesquera y cárnica – Se valorizarán los descartes y subproductos de las industrias pesquera y cárnica mediante el desarrollo de tecnología basada en hidrólisis enzimática para la producción sostenible de concentrados de péptidos bioactivos y aminoácidos libres con propiedades nutricionales y fisiológicas beneficiosas para la salud, y con sabor y palatabilidad adecuados para su uso como ingredientes en piensos de acuicultura. Para ello se optimizará la producción de hidrolizados enriquecidos en péptidos bioactivos con destacadas actividades de tipo antiinflamatorio, antioxidante y antimicrobiano, para analizar posteriormente posibles efectos beneficiosos "in vivo" (CSIC1), mediante el empleo de diferentes indicadores moleculares, metagenómicos y de comportamiento del estado metabólico y de bienestar de doradas en cultivo (ver tareas 3.1.1 y 3.2.1). Por otra parte, también se desarrollarán hidrolizados proteicos con alto contenido en aminoácidos libres, que aseguren una alta biodisponibilidad, para la sustitución parcial de la harina de pescado y valorar su eficiencia en ensayos de laboratorio y pruebas "in vivo" de crecimiento en camarón (UPV9) (tarea 3.2.2.).

Responsable: CSIC6

Participantes: CSIC1, CSIC7, CSIC8, UPV9

Resultado: Se ha partido de un subproducto de la industria cárnica como es la sangre higiénicamente recogida en un matadero colaborador. Este subproducto ha sido pretratado mediante ultrasonidos y sometido a distintos tratamientos de hidrólisis enzimática secuencial con proteasas para conseguir un hidrolizado con un alto contenido de péptidos pequeños y aminoácidos libres que es sometido a un

proceso de filtración por tamaño molecular inferior a 10 KDa, seguido de atomización, que da lugar al producto en polvo. Se han optimizado las condiciones del pretratamiento, tipos de enzima e hidrólisis enzimática. El proceso ha sido objeto de patente recientemente registrada. Se han determinado el grado de hidrólisis y la composición del hidrolizado en proteínas, perfil de péptidos y contenido de aminoácidos libres y totales. Asimismo, se ha determinado la actividad biológica del hidrolizado en cuanto a las actividades antioxidante, hipoglucémica, inhibidora de la monoacilglicerol lipasa, antiinflamatoria, y antimicrobiana. Se han obtenido altos valores de todas las actividades mencionadas, a excepción de la antimicrobiana que fue nula. Una vez caracterizado el hidrolizado, se procedió a su inclusión en una dieta experimental de bajo contenido en harinas de pescado (ALT, Tarea 3.2.1), lo que mostró en un ensayo de engorde de dorada (CSIC1) que el hidrolizado disminuye la agresividad de los individuos, al mismo tiempo que mejora su capacidad natatoria y la eficacia energética. Asimismo, se realizó la purificación cromatográfica del hidrolizado para determinar los perfiles peptídicos con su bioactividad, y espectrometría de masas para determinar las secuencias, especialmente de aquellos responsables de la bioactividad observada. Otra actividad se ha centrado en el uso de subproductos de trucha, habiéndose caracterizado el mismo, ensayado distintas enzimas y condiciones de hidrólisis, y determinado actividad antioxidante e hipoglucémica. Paralelamente se han generado dos hidrolizados de carcasa de pollo para su inclusión y ensayo en piensos de camarón en colaboración con UPV9.

Grado de consecución: 80%

Impacto: Los resultados representan un avance en la valorización de subproductos cárnicos y pesqueros al convertir residuos, como la sangre de matadero y subproductos de trucha, en hidrolizados proteicos de alto valor nutricional y funcional. El proceso optimizado de hidrólisis y la posterior inclusión del hidrolizado en piensos no solo permite aprovechar estos recursos, sino que además promueve el crecimiento eficiente de los peces y la mejora del bienestar, por lo que se ha solicitado patentar su uso como suplemento nutricional (CSIC6-CSIC1). Co-dirección tesis doctoral (CSIC6-CSIC1).

Tarea 3.3.2. (M3-M45) - Ácidos grasos de invertebrados – Se estudiará el rol de invertebrados acuáticos como generadores de ácidos grasos esenciales con vistas a su posible inclusión en piensos o como alimento directo. Se abordará el estudio de los mecanismos moleculares que explican la biosíntesis de lípidos fisiológicamente esenciales, como LC-PUFAs y VLC-PUFAs, en invertebrados acuáticos, especialmente anélidos y crustáceos, con el fin de establecer las condiciones de cultivo que favorezcan la activación de las rutas biosintéticas, contribuyendo a la generación de biomasas de alto valor nutricional (ricas en ácidos grasos esenciales) que pueden utilizarse “per se” o en piensos, como ingredientes. Se hará especial énfasis en los efectos de la temperatura como factor modulador, entre otras cosas por las posibles implicaciones que pudiera tener en escenarios de cambio climático asociados al uso de invertebrados en sistemas de acuicultura multitrófica integrada.

Responsable: CSIC8

Resultado: Sorprendentemente, la capacidad de los invertebrados marinos para la biosíntesis de n-3 LC-PUFA ha permanecido en gran medida sin explorar, a pesar de su posición clave en las redes tróficas marinas entre los microorganismos y los peces. Los resultados obtenidos en esta tarea indican que invertebrados tales como los poliquetos nereidos y los copépodos harpacticoides poseen capacidad de síntesis “de novo” LC-PUFA, lo que los postula como candidatos ideales en estrategias de economía circular tendientes a transformar residuos de las industrias agroalimentarias y forestales en biomasas de alto valor funcional. Esta tarea complementa la información generada en la Tarea 3.2.3, ahondando en la potencialidad de los invertebrados como generadores netos de LC-PUFA, estudiando el efecto de factores ambientales (salinidad y temperatura), y dietarios (dietas pobres y ricas en LC-PUFA, y hierro) con el fin de optimizar las condiciones para producir biomasas del máximo valor nutricional desde el punto de vista de su composición en ácidos grasos con vistas a su utilización en la elaboración de piensos o incluso en su uso directo como alimento de acuicultura, en estrategias de economía circular. Se están realizando ensayos de alimentación de poliquetos con distintas materias primas (subproductos de actividades

productivas agrícolas y de la acuicultura), estudiando los perfiles de ácidos grasos de la biomasa resultante.

Grado de consecución: 75%

Impacto: Los resultados destacan la capacidad de los invertebrados marinos, como poliquetos nereidos y copépodos harpacticoides, para sintetizar “de novo” ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (n-3 LC-PUFA). Esta capacidad los convierte en candidatos ideales para estrategias de economía circular, transformando residuos agroalimentarios y forestales en biomásas de alto valor funcional.

Tarea 3.3.3. (M6-M45) - Inclusión en piensos de ingredientes funcionalizados – Se estudiará la inclusión en piensos de ingredientes funcionalizados con antimicrobianos de origen natural sobre partículas de óxido de silicio, arcillas y celulosa, con mejor conservación y beneficiosos para la salud y producción de especies cultivables. Se propone por una parte la estabilización de antimicrobianos de origen natural tanto por encapsulación en nanoarcillas, como por inmovilización en partículas de óxido de silicio amorfo y/o celulosa cristalina. Se estudiará la inclusión en piensos langostinos y doradas de ingredientes funcionalizados con antimicrobianos de origen natural sobre partículas de óxido de silicio, arcillas y celulosa. Tras la alimentación de estas dos especies con los piensos diseñados se determinará el efecto de la suplementación sobre el crecimiento, la reproducción y el estado de salud de los ejemplares. En paralelo a estas experiencias, se evaluará si la incorporación de antimicrobianos naturales encapsulados o inmovilizados a la formulación de piensos tiene algún efecto en la prevención del desarrollo de microorganismos, y especialmente mohos productores de micotoxinas.

Responsable: UPV5

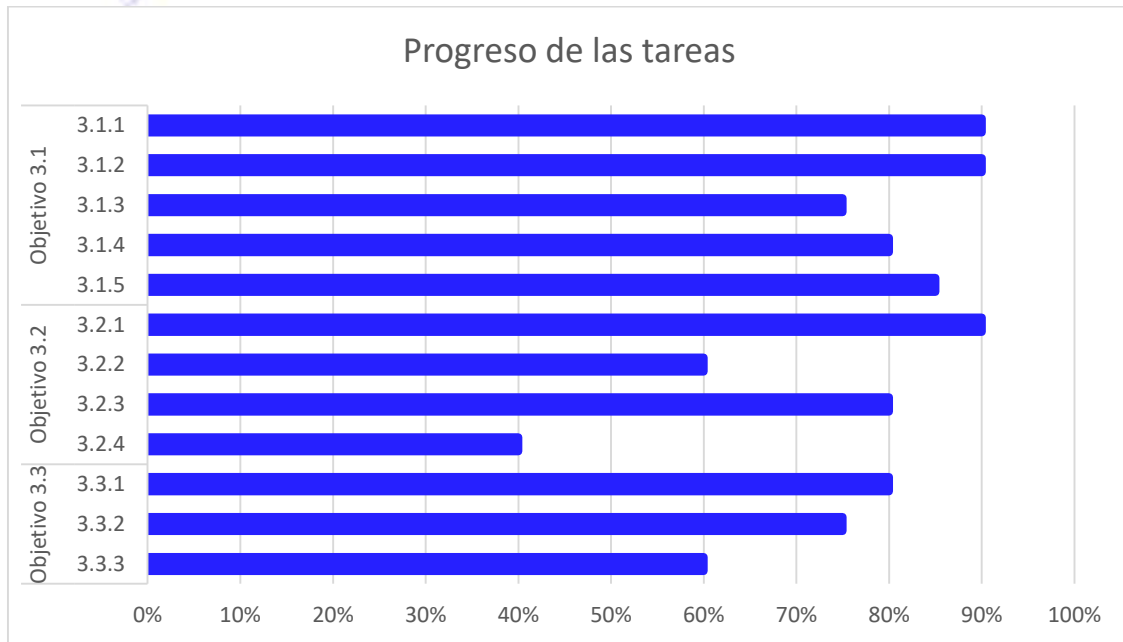
Participantes: UPV9, CSIC1

Resultado: Se han probado distintas rutas para inmovilizar carvacrol, timol y ácido cinámico en sílice y celulosa microcristalina, evaluándose su eficacia frente a *E. coli*. De los resultados obtenidos, el o-carvacrol, el p-carvacrol y el p-timol inmovilizados sobre sílice presentan una MIC (concentración mínima inhibitoria) de 1 mg/mL. Los compuestos inmovilizados sobre celulosa presentaron una menor eficacia, y se descartaron. El carvacrol inmovilizado en orto en sílice también inhibió el crecimiento de otras bacterias. Se ha evaluado la acción de diferentes compuestos de aceites esenciales (CAEs) sobre el crecimiento de diferentes tipos de mohos. De todos los compuestos ensayados, los de mayor actividad frente a estos mohos han sido carvacrol (Ca), timol (Thy) y cinamaldehído (Cin). Se probaron diferentes arcillas para encapsular los compuestos de aceites esenciales, seleccionándose la montmorillonita. Se han empleado diferentes formas de encapsulación, siendo la volatilización el mejor para lograr una encapsulación efectiva. De los ensayos in vitro realizados, se demostró una mayor efectividad de los compuestos encapsulados frente al crecimiento de *A. flavus* y *F. sporotrichioides*, en comparación con los libres. La combinación de Ca y Thy ensayada no mostró un efecto sinérgico en la inhibición microbiana. Por otra parte, en las pruebas realizadas con piensos para dorada y langostino (suministrados por los grupos CSIC1 y UPV9) incorporando los 3 CAEs comentados anteriormente, no se ha observado efecto inhibitorio de los CAEs ni libres ni encapsulados, sobre el crecimiento de mohos, lo que podría deberse a que los componentes del pienso están interaccionando con los CAEs inhibiendo su acción antimicrobiana. Los resultados del efecto de estos compuestos sobre la oxidación de los piensos son similares al efecto antimicrobiano, aunque los resultados no son concluyentes, dado que se ha observado un índice de oxidación bajo en los piensos control. Se sigue evaluando el efecto de la oxidación empleando otros métodos.

Grado de consecución: 60%

Impacto: Este estudio tiene un impacto importante en el desarrollo de alternativas naturales para el control de bacterias y mohos en aplicaciones biotecnológicas y agroindustriales. La inmovilización y encapsulación de carvacrol, timol y ácido cinámico sobre soportes específicos como sílice y montmorillonita ofrecen nuevas posibilidades para crear agentes antimicrobianos más efectivos y duraderos.

Progreso de las tareas a M33



Siendo el M1 enero del 2022