
OBJETIVO 3.1

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

Conexión con las líneas de actuación del plan nacional

Líneas de actuación A2: Acuicultura sostenible, inteligente y de precisión

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.

Descripción de tareas

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, UJI2

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 UJI2, 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 (Aquaculture 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.