UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

**EFFECTO DE *ARTHROSPIRA PLATENSIS* SOBRE EL
COMPORTAMIENTO Y FLORA INTESTINAL DE
*OREOCHROMIS NILOTICUS***

TESIS DOCTORAL

AUTOR: *IGNACIO PLAZA GORDO*

INGENIERO AGRONOMO SUPERIOR

Madrid 2018

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

**EFFECTO DE *ARTHROSPIRA PLATENSIS* SOBRE EL
COMPORTAMIENTO Y FLORA INTESTINAL DE
*OREOCHROMIS NILOTICUS***

AUTOR: *IGNACIO PLAZA GORDO*
Ingeniero Agrónomo Superior

DIRECTORES: *MORRIS VILLARROEL ROBINSON*
Doctor en Biología
JOSE LUIS GARCÍA LÓPEZ
Doctor en Química y Bioquímica

DEPARTAMENTO DE PRODUCCION AGRARIA

MADRID 2018

D. Morris Villarroel, Profesor Titular del Departamento de Producción Agraria de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas de la Universidad Politécnica de Madrid.

D. José Luis García López, Profesor de Investigación de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas del Departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) de Madrid.

Certifican: Que la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada: “*Efecto de *Arthrospira platensis* sobre el comportamiento y flora intestinal de *Oreochromis niloticus*””, del que es autor el Ingeniero Agrónomo Superior **Ignacio Plaza Gordo**, ha sido realizada bajo nuestra dirección conjunta, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en el programa Tecnología Agroambiental para una Agricultura Sostenible.*

Para que conste, firman los presentes en Madrid, septiembre, 2018.

Fdo.: D. Morris Villarroel

Fdo.: D. José Luis García López

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradeceré a mis padres y abuelos, mis mecenas, que han trabajado duro para que yo pudiera dedicarme a mis estudios.

A todos aquellos que se preocuparon de mi educación, en especial en estos últimos meses, a mis tutores y amigos, José Luis García, Beatriz Galán y Morris Villarroel.

A la colaboración de la escuela en la E.T.S.I. Montes por prestarme su tiempo y conocimientos. También agradecer al doctor y compañero de tesis Rubén Bermejo-Poza, que sin su inestimable ayuda y espíritu no hubiera llegado al final de esta tesis.

A mi novia por aguantarme estos meses sin parar de hablar de algas, peces, sensores y cosas por el estilo, y no sólo por escucharme si no por aportar su granito de arena a este trabajo.

Y a mis hermanos, sin vuestra colaboración esto no hubiera sido posible.

Este trabajo se realizó dentro del proyecto INSPIRA1 (Ref. S2013 / ABI2783) financiado por la Comunidad de Madrid y cofinanciado por Fondos Estructurales de la Unión Europea FEDER

INDICE

INDICE GENERAL

LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
1 REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	8
1.1 UN POCO DE HISTORIA	8
1.2 ESPIRULINA " <i>ARTHROSPIRA</i> SP."	10
1.2.1 Especies y distribución mundial	11
1.2.2 Producción mundial de la <i>Arthrospira</i> sp.....	11
1.2.3 Usos actuales de la <i>Arthrospira</i> sp.	13
1.2.4 Características nutricionales de la <i>Arthrospira</i> sp.....	14
1.2.5 Aplicación de <i>Arthrospira</i> sp. en animales	19
1.3 TILAPIA DEL NILO " <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> SP."	22
1.3.1 Producción mundial de <i>Oreochromis niloticus</i>	24
1.3.2 Características nutricionales de <i>Oreochromis niloticus</i>	25
1.4 EFECTO DE <i>ARTHOSPIRA PLATENSIS</i> EN <i>OREOCROMIS NILOTICUS</i>	28
1.4.1 Supervivencia, crecimiento, y calidad de la carne.....	28
1.4.2 Bienestar animal y Estrés	32
1.4.3 Como valorar el estrés	36
1.4.4 Microbiota Intestinal	40
2 FUNDAMENTOS Y OBJETIVOS.....	46
2.1 FUNDAMENTOS	46
2.2 OBJETIVOS	47
3 MATERIAL Y MÉTODOS	50
3.1 INSTALACIONES	50

3.2	CULTIVO DE <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i>	51
3.2.1	Base biológica	52
3.2.2	Manejo del cultivo	52
3.3	ANIMALES Y ALOJAMIENTO.....	64
3.3.1	Calidad del agua	64
3.3.2	Base biológica de <i>O. niloticus</i>	65
3.3.3	Tanques utilizados.	68
3.4	ALIMENTO.....	72
3.5	DISEÑO EXPERIMENTAL	74
3.5.1	Consideraciones de bienestar animal al sacrificio	74
3.5.2	Prueba 1 Two-Choices	74
3.5.3	Prueba 2 Pre-Engorde.....	75
3.5.4	Prueba 3 Metagenómica	76
3.6	Técnicas y métodos experimentales	77
3.6.1	Crecimiento de los peces y supervivencia de los alevines	77
3.6.2	Two-choices test.....	78
3.6.3	Prueba 2. Parámetros biométricos	80
3.6.4	Parámetros de calidad de la carne.....	81
3.6.5	Parámetros hematológicos.....	83
3.6.6	Metagenómica Análisis	86
3.7	Análisis estadístico	92
4	RESULTADOS	96
4.1	Experimentos con alevines de tilapia “Two-Choices”	96
4.1.1	Crecimiento y supervivencia de peces.....	96
4.1.2	Prueba “Two-Choices”	97
4.2	Engorde y calidad de la carne de tilapia	98
4.2.1	Crecimiento y supervivencia	98

4.2.2	Análisis de sangre.....	99
4.2.3	Calidad de la carne	99
4.2.4	Microbiota intestinal.....	103
5	DISCUSIÓN.....	110
5.1	Prueba 1 Alevinaje y <i>Two-Choices</i>	110
5.1.1	Crecimiento y supervivencia	110
5.1.2	Two-choices.....	111
5.2	Prueba 2, Pre-engorde.....	112
5.2.1	Engorde.....	112
5.2.2	Análisis sanguíneo.....	114
5.2.3	Calidad de la carne	115
5.2.4	Microbiota intestinal.....	116
6	CONCLUSIONES.....	122
6.1	Crecimiento.....	122
6.2	Comportamiento y estrés	122
6.3	Calidad de la carne.....	123
6.4	Efecto del suplemento de <i>espirulina</i> sobre el microbiota intestinal de la tilapia. .	123
7	BIBLIOGRAFÍA.....	126
	ANEXO 1 PUBLICACIONES.....	142
	Effect of spirulina (<i>Arthrospira platensis</i>) supplementation on tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) growth and stress responsiveness under hypoxia	144
	Effect of <i>Arthrospira</i> supplementation on <i>Oreochromis niloticus</i> gut microbiota and flesh quality	156
	ANEXO 2 KRONA.....	182
	ANEXO 3 ARDUINO.....	192

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1 Resumen de la producción de <i>Arthrospira</i> sp. (en toneladas) en los principales países productores desde el año 2010 (FAO FishStats 2017).	12
Tabla 1.2 Composición bioquímica de <i>Arthrospira</i> sp. (100 g) Datos de USDA 2017	14
Tabla 1.3 Composición en aminoácidos esenciales (g/100g) tipo aportados por <i>Arthrospira</i> sp. (IIMSAM, 2012; Herickson, 1989) vs. Recomendaciones de necesidades para humanos (FAO), tilapia (Fitzsimmons, 1997), y las contenidas en <i>Chlorella</i> sp. y huevo (Quevedo, 1999).	15
Tabla 1.4 Cuadro resumen de la cantidad y calidad de la proteína (UNP, utilización neta proteica) en alimentos comunes, incluyendo a <i>Arthrospira</i> sp. y algunas algas comunes. Datos de Quevedo (1999), y Henrikson (1989).	15
Tabla 1.5 Composición en lípidos principales en <i>Arthrospira</i> sp. en % de ácidos grasos y lípidos totales (según Maza <i>et al.</i> , 2011).	16
Tabla 1.6 Composición en carbohidratos de <i>Arthrospira</i> sp. (% de Carbohidratos), según Pignolet <i>et al.</i> (2012) y Cohen <i>et al.</i> (2014).	17
Tabla 1.7 Composición pigmento-vitámica de <i>Arthrospira</i> sp. (mg/kg MS). Datos de IISAM 2012, USDA 2017. Necesidades en la dieta de Tilapia (Fitzsimmons, 1997).	18
Tabla 1.8 Composición mineral de tipo de <i>Arthrospira</i> sp. (mg/kg MS). IISAM (2012) y USDA (2017). Necesidades en la dieta de Tilapia (Fitzsimmons, 1997).	18
Tabla 1.9 Estadística pesquera de <i>O. niloticus</i> en los países de máxima captura. Datos en toneladas (FAO Stast, 2017).	23
Tabla 1.10 Producción mundial de tilapia cultivada en toneladas en el periodo comprendido entre el 2010 y el 2014. Datos obtenidos de FAO Fish-Stats (2017).	24
Tabla 1.11 Composición bioquímica de la <i>O. niloticus</i> (100 g) según Dale <i>et al.</i> (2004).	25
Tabla 1.12 Composición en aminoácidos de la <i>O. niloticus</i> (g/100g) de Dale <i>et al.</i> (2004) vs, patrón nutricional FAO (2011).	26
Tabla 1.13 Composición en ácidos grasos de la <i>O. niloticus</i> (g/100g). Dale <i>et al.</i> (2004). ..	26
Tabla 1.14 Composición en minerales de la <i>O. niloticus</i> (g/100 g). Dale <i>et al.</i> 2004.	27
Tabla 1.15 Cambios en algunos parámetros de la tilapia del Nilo (<i>O. niloticus</i>) después de 24 h de exposición a hipoxia, sobrepoblación y hambre (EL-Khaldi, 2010).	36
Tabla 1.16 Eficiencia de asimilación (EA) de las microalgas por la <i>O. niloticus</i> en % según Moriarty y Moriarty (1973).	40

Tabla 1. 17 Cuadro resumen de la metagenómica aplicada en microbiota intestinal de peces.	43
Tabla 3.1 Observaciones en el cultivo de <i>A. platensis</i> según Xarxa espirulina (2016) y observaciones propias.....	54
Tabla 3.2 Composición mineral del medio de cultivo de <i>Arthrospira</i> sp. Zarrouk (1966). ..	56
Tabla 3.3 Calendario de trabajo en el cultivo de <i>A. platensis</i> en el invernadero.....	60
Tabla 3.4 Indicadores fisiológicos basales de la calidad de agua según Branson (2000).	64
Tabla 4.1 Composición aproximada de dietas experimentales (materia seca, cenizas, proteína bruta PB, extracto de éter de éter EE, fibra detergente neutro FDN, fibra detergente ácida ADF, lignina de detergente ácido ADL y energía bruta).	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Mujeres recolectado Díhe (<i>Arthrospira platensis</i>) de manera tradicional, en el lago Chad (Republica del Chad, África Central). Fuente: Marzot (2004).	9
Figura 1.2. Uno de los más antiguos bajo relieves egipcios de 4000 años que muestra la tilapia criada en estanques (Gigal, 2012).....	9
Figura 1.3. <i>Arthrospira</i> sp. Imagen de microscopia óptica (Fuente: PELLAGOFIO nº 33 (2ª época, julio/agosto 2015).....	10
Figura 1.4 Distribución mundial de los afloramientos naturales de <i>Arthrospira</i> sp. Datos IIMSAM 2012.	11
Figura 1.5 Producción mundial de <i>Arthrospira</i> sp. en toneladas (verde) y 1000 USD (rojo). Datos de FAO FishStats (2017).....	12
Figura 1.6 Diversos productos que se pueden encontrar en el mercado que contienen <i>Arthrospira</i> sp. a) en polvo "Natur Green, b) crema corporal "Ella Baché", c) pasta (tallarines) "DXN", d) infusiones "Kona Green" y e) jabón " Flor de Lis".	13
Figura 1.7 Estructura química de la ficobilina presente en la ficocianina. Zheng <i>et al.</i> , 2013.	17
Figura 1.8 Distribución geográfica de las poblaciones originarias de <i>O. niloticus</i> y sus sub-especies (Beveridge y Baird, 2000; FAO, 2017).....	22
Figura 1.9 Diferencia de coloración de <i>O. niloticus</i> linnaeus, 1758 (Cichlidae). Arriba se puede ver los colores pardo-grisáceos normales de la tilapia salvaje. Debajo se puede observar los colores verde-rojizos y negros correspondientes a la librea de apareamiento.	23
Figura 1.10 Pesca, producción y valor en USD, de tilapia del Nilo desde 1950. Datos obtenidos de FAO Fish-Stats (2017).	24
Figura 1.11 Procesos bioquímicos en peces durante la fase <i>post-mortem</i> y principales indicadores de calidad de la carne (adaptado de Poli <i>et al.</i> (2005)).	30
Figura 1.12 Esquema de adaptación al estrés según la bibliografía existente.....	34
Figura 1.13 Esquema de la respuesta al estrés eje CRH-ACTH-Cortisol. Según la bibliografía existente.	35
Figura 1.14 Molécula de cortisol. (11β)-11,17, 21-trihidroxipregn-4-eno-3,20-diona	37
 Figura 3.1 Invernaderos de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid situados a 40.446353 N -3.738341 E.....	50

Figura 3.2 Instalaciones de Acuicultura de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes de Madrid, situadas a 40.450806 N, -3.721382 E.	50
Figura 3.3 <i>A. platensis</i> PCC9018. Imagen de microscopia óptica, del cultivo utilizado durante los experimentos realizados en 2016.	52
Figura 3.4 Fases de arranque de cultivo de <i>A. platensis</i>	53
Figura 3.5 Algas que son posibles contaminantes del cultivo de <i>A. platensis</i> como <i>Chlorella</i> sp. (A), <i>Anabaena</i> sp. (B), <i>Anabaenopsis</i> sp. (C), y <i>Microcystis</i> sp. (D).	53
Figura 3.6 Cultivo de <i>A. platensis</i> en bio-reactores tubulares en el invernadero de la ETSIAAB. Se puede observar la diferencia de densidad entre el cultivo de la izquierda (recién cosechado) y el de la derecha (esperando a ser cosechado).	57
Figura 3.7 Dimensiones de los FBR de plástico utilizados para el cultivo de <i>A. platensis</i>	58
Figura 3.8 Sensor de turbidez desarrollado con Arduino Leonardo, el sensor de color OPT 101 (Burr-Brown) y piezas de Lego®.	59
Figura 3.9 Foto realizada durante la fase de calibrado del sensor de turbidez.	59
Figura 3.10 Curva de crecimiento de la <i>Arthrospira</i> expresado en g/L en peso seco. Los puntos representan las medidas de concentración obtenidas, y la línea verde es la curva obtenida, mediante ajuste logístico del tipo $[a / (1+\exp(b-c*t(d)))]$	60
Figura 3.11 Izquierda, Foto realizada durante un día de cosecha de <i>A. platensis</i> con maya de 46 µm. Derecha, esquema del FBR, así como las indicaciones cosecha y alimentación.	61
Figura 3. 12 Diferenciación sexual en <i>O. niloticus</i>	66
Figura 3. 13 Esquema de la técnica para la obtención de Supermachos	67
Figura 3.14 Tanques troncocónicos utilizados, dimensiones, y flujo de agua con el desagüe en la parte inferior y salida al filtro a 1/4 de la base.....	68
Figura 3.15 Filtros EHEIM classic; Mod 2217 con su conformación para el experimento. .69	
Figura 3.16 <i>Race-ways</i> utilizados en la prueba de pre-engorde y metagenómica. Dimensiones, y flujo de agua.	71
Figura 3. 17 Piensos utilizados en las distintas pruebas. A) piensos en granulo de 0,1 - 0,2 Ø cm para la prueba de alevines, B) pienso peletizado a 0,5 - 0,7 Ø cm para la prueba de pre-engorde y metagenómica.	72
Figura 3.18 Fotografía de la entrada del pez E9B6. Cada pez fue identificado individualmente con un microchip (i-Tag 162,2x12 mm) colocado bajo la aleta dorsal, medido, fotografiado y asignado a uno de los tratamientos.	76
Figura 3.19 Fotografía utilizada para poder medir y contar los alevines a la entrada a los tanques.	77

Figura 3.20 Fotografía de los tanques durante los ensayos del experimento “ <i>Two-Choices</i> ”, en los invernaderos de los campos de prácticas de Agrónomos, UPM.	79
Figura 3.21 Esquema y medidas de los tanques utilizados para la realización de la prueba de “ <i>Two-Choices</i> ”.....	80
Figura 3.22 Trabajos de aturdimiento, pesado y medición en la prueba de pre-engorde.....	81
Figura 3. 23 Evolución y medición del <i>rigor mortis</i> . Método Cuttinger (Korhonen <i>et al.</i> , 1990).....	82
Figura 3.24 Fotografía de la medición de pH y la T ^a durante uno de los ensayos.	82
Figura 3.25 Modelo CIELAB.....	83
Figura 3. 26 Puesta a punto del protocolo de secuenciación de los genes marcadores del microbiota del intestino de <i>O. niloticus</i> . (A) Toma de muestras del intestino, (B) extracción, limpieza y extracción del contenido bacteriano del intestino, (C) lisis y extracción de ADN y amplificación del gen 16S-ARNr, (D) Ligación 16S-pGEM-T® Vector, (E) transformación <i>E. coli</i> , (F) cultivo de <i>E. coli</i> en LB+ampicilina y selección de colonias blancas (recombinantes), (G+H) extracción de plásmidos mediante el kit <i>high pure plasmid isolation miniprep</i> de Roche ®; (Y) secuenciación de los insertos con los 16S-ARNr clonados; (J) revisión de las secuencias en la biblioteca on-line (NCIB); (K) identificación de los genes encontrados.....	87
Figura 3.27 Mapa del plásmido p-GEM®-T Easy Vector.	88
Figura 3.28 Esquema del protocolo de extracción del ADN de la microbiota intestinal de <i>O. niloticus</i> utilizado durante la tesis: (A) toma de muestras del intestino; (B) extracción, limpieza y extracción del contenido bacteriano del intestino; (C) lisis y extracción del ADN total; (D) amplificación del 16S-ARNr; (E) secuenciación en MiSeq de los amplicones 16S-ARNr; (F) ensamblaje de secuencias e identificación computacional con los programas Silva y QIIME.	89
Figura 3.29 Esquema del procedimiento de extracción de ADN del Stool Mini Kit de QIAamp.	90
 Figura 4.1 Tiempo de salida (min) de los primeros cinco peces por tratamiento, diferenciando entre los controles (●) y los suplementados con <i>A. platensis</i> (▲). La línea azul claro es la concentración de O ₂ en ppm en el Tanque A. La línea azul oscuro es la curva de regresión obtenida con los datos de oxígeno medios durante la prueba, para conocer a qué nivel de O ₂ respondió cada pez, (O ₂ (ppm) = 1,78 + 6,19·0,94 ^{t (min)}) (r = 0,98).....	97

Figura 4.2 Curvas de espectro reflectancia de la carne de <i>O. niloticus</i> sp. a 0 h y 24 h tras el sacrificio. Para dos tratamientos distintos, control (CRT) y suplementada al 3% de <i>A. platensis</i> (SPR). Las barras marcan los rangos donde se encontró diferencia significativa en la reflectancia (%) entre tratamientos a las 24 h.....	102
Figura 4.3 Grafica jerárquica en Krona, nivel de especie, de uno de los individuos de la prueba. Identificados con las siglas del tratamiento SPR (suplementados con <i>A. platensis</i>) y con los cuatro dígitos de su chip.....	103
Figura 4.4 Abundancia relativa, nivel <i>phyla</i> , de bacterias encontradas en el intestino de 16 individuos <i>O. niloticus</i> en dos tratamientos alimentados diferentes, 8 individuos con dieta control (CTR) y 8 individuos suplementados con <i>A. platensis</i> (SPR), incluyendo medias por tratamiento y media total.	105
Figura 4.5 Abundancia media relativa, nivel género, de bacterias encontradas en el intestino de 16 individuos <i>O. niloticus</i> en dos tratamientos alimentados diferentes, 8 individuos con dieta control (CTR) y 8 individuos suplementados con <i>A. platensis</i> (SPR).....	106
 Figura 5.1 Análisis de similitud de grupos de bacterias intestinales de diferentes estudios en <i>Oreochromis</i> usando la prueba de Bray-Curtis. Utilizando los datos medios de los contribuidos por el control de peces de los diversos estudios realizados por los autores. ...	117

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	Antes De Cristo
ACTH	Hormona Adrenocorticotropa
ADF	Fibra Acido Detergente
ADL	Lignina de Detergente Ácido
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	Adenosín-5'-difosfato
ANOVA	Análisis de Varianza
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
CIB	Centro de Investigaciones Biológicas
CIE	Internacional Comisión De l'Eclairage
CRH	Hormona Liberadora de Corticotropina
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
CTR	Grupo Control
dNTPs	Deoxinucleósido Trifosfato
ECOSOC	Permanent Observer with the United Nations Economic and Social Council
EE.	Extracto Etéreo
ELISA	Enzimo-Inmunoanálisis Competitivo
ETSIAAB	Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas
ETSIM	Escuela Técnica Superior De Ingenieros De Montes
FAO	Food and Agriculture Organization
FAWC	Farm Animal Welfare Committee
FBR	Foto-Bio-Reactor
GMD	Ganancia Media Diaria
GMT	Ganancia Media Del Tanque
GOD	Enzima Glucosa Oxidasa
HPI	Eje Hipotálamo-Pituitaria-Intrarrenal
HRPO	Cortisol Conjugado Por La Peroxidasa De Rábano Picante
IC	Índice de Conversión
IIMSAM	Intergovernmental Institution for the use of Micro-Algae against Malnutrition
LDH	Lactato Deshidrogenasa
LO	Lactato Oxidasa
MS	Materia Seca
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NAT	Nitrógeno Amoniacal Total
NCIB	National Center For Biotechnology Information
NDF	Fibra Neutro Detergente
PB	Proteína Bruta
PBS	Solución Salina Tamponada Con Fosfato
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIT	Peso Inicial Del Tanque
PM	Peso Húmedo
POD	Defectos de Oxidación de Piruvato
PS	Peso Seco
PUFAs	Ácidos Grasos Altamente Poli-Insaturados
RAS	Recirculation Aquaculture System

S.	Siglo
SBS	Sequencing by Synthesis
SPR	Grupo <i>Arthrospira platensis</i>
Srv	Supervivencia
TAG	Triacilglicéridos
UNP	Unidad Neta Proteica
UPM	Universidad Politécnica De Madrid
USD	United States Dollars
USDA	United States Department of Agriculture

RESUMEN

RESUMEN

Estudios recientes han demostrado que la suplementación de alimentos con *Arthrospira* sp. tiene un efecto beneficioso sobre la salud y el crecimiento de los peces, pero se sabe poco acerca de sus posibles efectos sobre la capacidad de respuesta al estrés, o cómo la administración de suplementos afecta al microbiota intestinal o la calidad de la carne.

En el primer estudio, se administró alimento suplementado con *Arthrospira platensis* (CP 9108) al 0 % y al 1 % en alevines de *Oreochromis niloticus*, de aproximadamente 10 mg de peso vivo al inicio del período experimental. Estos se dividieron en dos tratamientos (n = 16 tanques, 8 tanques / tratamiento, 25 alevines / tanque). Ambas dietas fueron isocalóricas e isonitrogenadas (5,00 / 4,98 kcal / g MS y 44,6 / 44,8 CP% MS, respectivamente). La tasa de alimentación fue del 6% de peso vivo con cuatro comidas al día durante 50 días. Los tanques usados funcionaban bajo un sistema de recirculación. El aumento de peso por tanque, la tasa de crecimiento específica y la tasa de conversión alimenticia fueron similares entre los tratamientos, pero la suplementación con *A. platensis* aumentó significativamente la supervivencia ($p < 0.05$).

Tras el tratamiento se midió la respuesta al estrés en todos los peces de 12 de los tanques. Mediante una prueba no invasiva de “two-choice” (dos opciones). Para ello se necesitan dos tanques unidos por un canal, donde se presentan diferentes estímulos, y se observa la respuesta de los alevines a la situación. La prueba inicia colocando todos los peces de un mismo tanque (n = 6 por tratamiento), en el tanque A sombreado (situación favorable), mientras que el otro tanque B es iluminado (estresante). Seguidamente, se fue disminuyendo lentamente la concentración de O₂ en el tanque A. Los peces alimentados con *A. platensis* se mantuvieron significativamente ($P = 0,001$) más tiempo en el tanque A (30,20 min $\pm$ 13,22) que los controles (17,35 min $\pm$ 8,32), lo que sugiere una menor capacidad de respuesta al estrés y una mayor tolerancia a la hipoxia.

En el segundo estudio, se administró alimento suplementado con *A. platensis* (CP 9108) al 3% a juveniles de en torno a 109 g de *O. niloticus* durante un período de 50 días, y se comparó parámetros sanguíneos y de calidad de carne con los controles. Los niveles de triglicéridos y cortisol fueron mayores en los peces suplementados, aunque dentro de los parámetros normales aceptados para la especie. El crecimiento diario promedio fue mayor en los peces suplementados ($P < 0,05$). El *rigor mortis* se resolvió antes en peces suplementados ($P < 0,05$) indicando una posible vida útil más corta del producto. Todos estos datos sugieren un aumento

del metabolismo de los peces suplementados con *A. platensis*. Por otro lado, el color de la carne de los peces suplementados, fue más intenso a las 24 h *post-mortem* en el rango de 470-500 nm y 620-660 nm, lo que corresponde con un perfil de aumento de β -caroteno y ficocianina en los peces alimentados con *A. platensis*.

Finalmente, se tomaron 16 muestras (n=8 por tratamiento) de intestino de los peces utilizados en la segunda prueba para realizar su microbiota intestinal. Se obtuvieron un total de 5.470.272 lecturas de las 16 muestras, una diversidad gamma de 1563 especies. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos; Los patrones de diversidad alfa fueron similares (media $\pm$ SE, Simpson $0,80 \pm 0,08$, Shannon $2,68 \pm 0,53$, Margalef $38,07 \pm 8,65$, Caos $560,9 \pm 113,3$). El patrón del microbiota en el nivel de *phylum* observado se compone de 36,58% de Proteobacterias, y 32,85% de Fusobacterias, seguido de 9,24% de Actinobacterias. Esto sugiere que la suplementación con un 3% de *A. platensis* no afecta al microbiota intestinal de *O. niloticus*.

ABSTRACT

Several recent studies have shown that adding *Arthrospira* sp. to feed can have beneficial effects on the health and growth of fish, but less is known about its possible effects on the ability to respond to stress, or how supplementation affects gut microbiota or the quality of the meat.

In the first trial, feed was supplemented with 0% or 1% *Arthrospira platensis* (CP 9108) and fed to *Oreochromis niloticus* fry, of approximately 10 mg live weight. in two treatments (n = 16 tanks, 8 tanks / treatment, 25 fry / tank). Both diets were isocaloric and isonitrogenous (5.00 / 4.98 kcal / g MS and 44.6 / 44.8 CP% MS, respectively). The feeding rate was 6 % live weight, four meals a day for 50 days. Fish were kept in tanks in a recirculating system. The increase in weight per tank, the specific growth rate and the feed conversion rate were similar between treatments, but supplementation with *A. platensis* significantly increased survival ($p < 0.05$).

At the end of the trial, the stress response was measured in all the fish from 12 tanks. using a non-invasive "two-choice" test, where two tanks were joined by a tunnel, and different stimuli were presented, and the response of the fry was observed. The test started by placing all the fish in tank A (n = 6 per treatment) which was shaded (favourable situation), while the other tank B was lit (stressful). Then, the concentration of O₂ in the shaded tank was slowly decreased, forcing the fish to choose between stressful situations. It was observed that the fish fed with *A. platensis* stayed significantly ($P = 0,001$) longer in tank A (30.20 min $\pm$ 13.22) than the controls (17.35 min $\pm$ 8.32), which suggests a lower capacity to respond to stress and a greater tolerance to hypoxia.

During the second trial, feed supplemented with *A. platensis* (CP 9108) at 3% was administered to juveniles of around 109 g of *O. niloticus* during a period of 50 days, and blood and meat quality parameters were compared with controls. Significant differences were obtained in blood triglyceride and cortisol levels, which were higher in *A. platensis* fish, although within the normal parameters accepted for the species. The average daily growth was higher in the supplemented fish ($P < 0.05$). Rigor mortis was resolved earlier in *A. platensis* fish ($P < 0.05$) indicating a possible shorter shelf life of the product. All these data suggest an increase in the metabolism of fish supplemented with *A. platensis*. On the other hand, the meat colour of the supplemented fish was more intense at 24 h post-mortem was higher in the range

of 470-500 nm and 620-660 nm, which corresponds to an increase profile of β -carotene and phycocyanin in fish fed *A. platensis*.

Finally, 16 samples ($n = 8$ per treatment) were taken from the intestine of the fish used in the second test, to perform a gut microbiota test. A total of 5,470,272 readings were obtained from the 16 samples, a gamma diversity of 1563 species. No significant differences were found between the treatments; The alpha diversity patterns were similar (mean $\pm$ SE, Simpson 0.80 ± 0.08 , Shannon 2.68 ± 0.53 , Margalef 38.07 ± 8.65 , Chaos 560.9 ± 113.3). The microflora pattern at the level of *phylum* observed is composed of 36.58% of Proteobacteria, and 32.85% of Fusobacteria, followed by 9.24% of Actinobacteria. This shows that supplementation with 3% of *A. platensis* does not affect the intestinal microbiota of *O. niloticus*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1 REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

1.1 UN POCO DE HISTORIA

A lo largo de la historia las algas y microalgas han sido utilizadas por los humanos con diferentes propósitos. En China, se han encontrado referencias que se remontan al 2000 a.C., que dan constancia del uso del alga *Nostoc* en la alimentación humana. En Japón se tienen datos del consumo de algas desde el año 274 años a.C. En Europa las algas ya se vienen utilizando en las regiones costeras, regiones “pobres y desfavorecidas”, para alimentar animales, tal y como también se dio en Europa en las zonas costeras del Atlántico en Francia durante la Primera Guerra Mundial debido a la escasez de avena y forraje (Bacha, 2015).

Centrando la vista en el género de cianobacterias (coloquialmente mal consideradas como microalgas), del que va a tratar esta tesis doctoral, la primera referencia histórica sobre *Arthrospira* sp. la podemos encontrar en las crónicas de los Conquistadores españoles. En la Crónica de Francisco Hernández y la de Fray Toribio de Benavente siglo XVI se puede leer que habitantes de Tenochtitlán, hoy Ciudad de México, recolectaban mediante cuerdas y paños una especie de fango de color azul que denominaban "*Tecuitlatl*", en náhuatl "excremento de piedra". Mas tarde, ya en el S.XX, en los años 40 la revista de la Sociedad Linneana de Burdeos publicó la investigación de un ficólogo francés, *Dangeard*, que mencionaba el *dihé*, una sustancia consumida por el pueblo de Kanem (Henrikson, 1989; Abdulqader *et al.*, 2000). Veinticinco años más tarde al botánico Léonard, miembro de la expedición belga que recorrió el Sahara desde el Atlántico hasta el Mar Rojo, demostró que contenía esencialmente una microalga, la cianobacteria *Arthrospira platensis* (Paniagua-Michael *et al.*, 2004).

Figura 1.1. Mujeres recolectando Dihe (*Arthrospira platensis*) de manera tradicional, en el lago Chad (República del Chad, África Central). Fuente: Marzot (2004).

Las primeras menciones que encontramos de acuicultura se remontan al antiguo Egipto. Donde en bajo-relieves de una tumba egipcia de la época predinástica, que data de hace más de 4000 años puede verse como los egipcios cultivaban en tanques ejemplares de género Tilapia (*Oreochromis* sp.), género objetivo de este estudio. La tilapia del Nilo (*O. niloticus*) fue conocido por los egipcios con el nombre de *inet*, simbolizó el renacimiento, la vida y la fertilidad. Aparece con mucha frecuencia en las paletas de época predinástica (Nagada II) e incluso se encuentra representada en etiquetas de marfil del período tinita. Quizá el hecho de que los egipcios se fijaran en este animal fue porque este pez era del color del sol (rojizo) y además tenía una forma ovalada, es decir, reunía los requisitos idóneos para relacionarlo con Atum-Ra.

Figura 1.2. Uno de los más antiguos bajo relieves egipcios de 4000 años que muestra la tilapia criada en estanques (Gigal, 2012).

1.2 ESPIRULINA "*ARTHROSPIRA* SP."

La cianobacteria comúnmente conocida como Espirulina (*Arthrospira* sp.) es descendiente de las primeras formas de vida fotosintética. No siendo realmente una microalga, debido a algunas similitudes compartidas con las mismas, las cianobacterias se suelen englobar incorrectamente en el término microalgas. El género cianobacteria surgió hace más de 3500 millones de años y engloba a las bacterias responsables de crear la atmósfera actual (Henrikson, 1989). La *Arthrospira* sp. pertenece al orden de los *Oscillatoriales* (Figura 1.3), que flotan libremente en lagos tropicales y subtropicales alcalinos ricos en carbonato y bicarbonato. Se trata de un organismo multicelular foto-autótrofo que se agrupa formando tricomas o formas filamentosas, enrolladas en hélice levógira. La forma helicoidal es característica del género, pero la longitud y la dimensión de la hélice varía con la especie, incluso dentro de la misma especie. Estas diferencias parecen tener que ver con las condiciones ambientales de crecimiento y temperatura (Ciferri, 1983). El diámetro de las células se sitúa entre los 3-12 μm , mientras que el diámetro de la hélice varía entre los 50-80 μm . La forma helicoidal se mantiene en medio líquido, pero cuando se seca se forma una auténtica espiral (Ciferri, 1983).

Figura 1.3. *Arthrospira* sp. Imagen de microscopia óptica (Fuente: PELLAGOFIO n° 33 (2ª época, julio/agosto 2015)).

1.2.1 Especies y distribución mundial

De este género se conocen multitud de sub-especies. Las más relevantes son *Arthrospira platensis* que es originaria de África y Asia, seguida de *Arthrospira maxima* que es exclusiva de América Central y Sudamérica, y *Arthrospira pacifica*, endémica de Hawái. Su distribución a lo largo del globo la podemos observar en la Figura 1.4.

Figura 1.4 Distribución mundial de los afloramientos naturales de *Arthrospira* sp. Datos IIMSAM 2012.

A nivel nacional, *Arthrospira* sp. puede encontrarse de forma salvaje en el Parque Nacional de Doñana (Huelva). No siendo original de la Península, se cree que llegó transportada por las aves durante sus migraciones, como el flamenco rosa (*Phoenicopterus roseus*), provenientes de las lagunas volcánicas africanas anteriormente mencionadas, donde sí son oriundas.

1.2.2 Producción mundial de la *Arthrospira* sp.

Las principales compañías productoras de *Arthrospira* sp. se localizan en el continente asiático, donde su cultivo se lleva a cabo de manera intensiva dentro de estanques artificiales. Según los datos de la FAO, su producción viene oscilando entre 60 y 100 TM de biomasa por año a nivel mundial. La *Arthrospira* sp. se deshidrata y pulveriza para fabricar comprimidos o capsulas que se venden como suplementos alimenticios (Vonshak, 1997). La producción mundial se estima que posee un valor de unos 40000000 USD/anuales según datos de la FAO (Figura 1.5).

Figura 1.5 Producción mundial de *Arthrospira* sp. en toneladas (verde) y 1000 USD (rojo). Datos de FAO FishStats (2017).

Teniendo en cuenta los datos de la FAO de 2014, el principal productor mundial de *Arthrospira* sp. es China, que produce más del 99%. Excluyendo a China, aparecen países como Grecia que ocupa el segundo lugar, con un clima similar al español. Posteriormente aparecen países como Burkina Faso, República Centroafricana, México o Senegal (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Resumen de la producción de *Arthrospira* sp. (en toneladas) en los principales países productores desde el año 2010 (FAO FishStats 2017).

País (País)	2010	2011	2012	2013	2014
China	96910	72820	80050	81890	85530
Grecia	...	198	174	93	126
Burkina Faso	70	100	100	120	100
República Centroafricana	30	30	42	40	40
México	...	...	...	...	5.76
Senegal	1.6	0.06	...	1.8	3
Total	97016.6	73368.1	80366	82157.1	85804.8

A pesar de que la venta de *Arthrospira* sp. se encuentra en un mercado totalmente desarrollado, en España la producción y comercialización de esta cianobacteria es escasa, pudiéndose encontrar tan sólo en puntos de ventas especializados o a través de internet. Una de las empresas pioneras productoras nivel nacional se encuentra en el parque natural de Sierra Espuña (Murcia) donde existe una explotación familiar llamada ASN-Leader.

1.2.3 Usos actuales de la *Arthrospira* sp.

El principal interés de *Arthrospira* sp. radica en el consumo humano debido a los macronutrientes y micronutrientes que contiene, algunos de los llamados esenciales como los ácidos grasos omega-3, los solo pueden ser sintetizados en baja proporción por el organismo humano a partir de algunos precursores. También es interesante por otras propiedades que se le atribuyen, tales como incrementar los niveles de energía, reducir el estrés premenstrual, incrementar el rendimiento de atletas, mejorar el apetito y ofrecer protección antioxidante (Ramírez-Moreno *et al.*, 2006).

Arthrospira sp. se comercializa por sus atribuidas propiedades terapéuticas. En roedores y humanos parece tener efectos sobre la inmuno-regulación, así como ejercer otros efectos como antioxidante, como anti-cancerígeno, como antiviral, y ser activo contra la hiperlipidemia y la hiperglicemia (Belay & Gershwin2006; Liu *et al.*, 2000). Varias de las propiedades antes mencionadas se deben a algunos de los constituyentes de *Arthrospira* sp., entre los que destacan los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) omega-3y omega-6, el β -caroteno, el α -tocoferol, la ficocianina, los compuestos fenólicos y un complejo aislado recientemente, el denominado Ca-Spirulan (Ca-SP) que tiene actividad antiviral (Chamorro *et al.*, 2002).

Figura 1.6 Diversos productos que se pueden encontrar en el mercado que contienen *Arthrospira* sp. a) en polvo "Natur Green, b) crema corporal "Ella Baché", c) pasta (tallarines) "DXN", d) infusiones "Kona Green" y e) jabón " Flor de Lis".

1.2.4 Características nutricionales de la *Arthrospira* sp.

Esta cianobacteria es una fuente de alimentación rica en proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales y otros nutrientes (Tabla 1.2). Uno de sus principales usos es como suplemento alimenticio, ya sea en polvo, encapsulada, en tabletas, como sustituto de harina, en pastas para sopa, salsas, barras de granola, golosinas o bebidas instantáneas de frutas o vegetales (Sasson, 1997). El IIMSAM (The Intergovernmental Institution for the Use of Micro-algae Against Malnutrition), trabaja en multitud de países donde promociona el uso de *Arthrospira* sp. como solución para la malnutrición severa.

Tabla 1.2 Composición bioquímica de *Arthrospira* sp. (100 g) Datos de USDA 2017

Composición de <i>Arthrospira</i> sp.	en 100 g
Energía	290 kcal
Carbohidratos	23,90 g
Grasas	5,38 g
Saturadas	2,65 g
Mono-insaturadas	0,68 g
Poli-insaturadas	2,08 g
Proteínas	57,47 g
Agua	4,68 g

Arthrospira sp. está reconocida mundialmente por el Permanent Observer with the United Nations Economic and Social Council (ECOSOC), y está sujeta a la resolución E/2003/212, de 5 de marzo del 2003. *Arthrospira* sp. representa una alternativa a la malnutrición, no solo por sus propiedades nutritivas sino porque su cultivo y recolección son sencillas. Los estudios de toxicidad revelan que es inocua pudiéndose utilizar como suplemento alimenticio en animales y humanos (Chamorro y Salazar-Jacobo, 1995; Chamorro *et al.*, 1996).

1.2.4.1 Proteínas

Arthrospira sp. tiene un contenido en proteína total inusualmente alto, en torno al 65% en peso seco (Phang *et al.*, 2000). En la Tabla 1.3 se resume su composición de aminoácidos. Contiene todos los aminoácidos esenciales y en cantidades muy balanceadas, teniendo en cuenta las necesidades nutricionales del ser humano y los estándares FAO.

Tabla 1.3 Composición en aminoácidos esenciales (g/100g) tipo aportados por *Arthrospira* sp. (IIMSAM, 2012; Herickson, 1989) vs. Recomendaciones de necesidades para humanos (FAO), tilapia (Fitzsimmons, 1997), y las contenidas en *Chlorella* sp. y huevo (Quevedo, 1999).

Aminoácido	<i>Arthrospira</i> sp.2012	<i>Arthrospira</i> sp.1989	Patrón Humano	Nec.Tilapias	<i>Chlorella</i> sp.	Huevo
Isoleucina	6,40	3,50	3,20	4,30	4,82	5,80
Leucina	10,40	5,40	6,60	7,00	10,78	9,00
Histidina	4,50	2,90	2,00	5,00	7,70	6,70
Metionina	2,20	2,00	3,10 ¹	1,70	1,55	3,00
Fenilalanina	5,40	5,80	5,90 ²	4,50	6,02	5,30
Treonina	5,40	3,20	3,10	3,60	5,60	5,30
Triptófano	1,50	0,90	0,85	1,00	1,70	1,50
Valina	7,50	4,00	4,30	5,80	7,86	7,20

Incluye cisteína¹, incluye tirosina².

No obstante, se ha de tener en cuenta un factor muy importante que es la digestibilidad de la proteína puesto que no toda la proteína que se ingiere es digerida por el organismo. La digestibilidad de la proteína del género *Arthrospira* sp. se encuentra en torno al 62% (Henrikson, 1989), un porcentaje de digestibilidad similar a las proteínas de origen vegetal como el trigo (63%) o el tofu (65%), e inferior a las de origen animal como el pescado (80%) o el huevo (94%).

Tabla 1.4 Cuadro resumen de la cantidad y calidad de la proteína (UNP, utilización neta proteica) en alimentos comunes, incluyendo a *Arthrospira* sp. y algunas algas comunes. Datos de Quevedo (1999), y Henrikson (1989).

Alimento	Proteína (%)	UNP (%)	Proteína útil (%)
<i>Arthrospira</i> sp.	65	62	40,30
Huevo seco	47	94	44,18
Levadura de cerveza	45	50	22,50
<i>Chlorella</i> sp.	40	62	24,80
Harina de soja integral	37	61	22,57
Leche en polvo desnatada	36	82	29,52
Queso parmesano	36	70	25,20
Germen de trigo	27	67	18,09
Cacahuetes	26	38	9,88
Pollo	24	67	16,08
Pescado	22	80	17,60
Carne de buey	22	67	14,74
Semillas de sésamo	19	60	11,40
Harina de avena integral	15	66	9,90
Harina de trigo integral	14	63	8,82
Harina <i>Ulva</i> sp.	11	86	9,07
Harina <i>Laurencia johnstonii</i>	10	83	8,63
Harina <i>Sargassum sinicola</i>	9	91	8,47
Tofu húmedo	8	65	5,20
Arroz integral	8	60	4,80

Para obtener el porcentaje de proteína útil de un alimento se ha de multiplicar el porcentaje de proteína que contiene por el porcentaje de digestibilidad de la proteína. Desde este punto de vista, la *Arthrospira* sp. se acerca a los valores nutricionales del huevo, por encima de alimentos como la leche o la carne (Tabla 1.4).

1.2.4.2 Lípidos

El contenido en lípidos en *Arthrospira* sp. es de aproximadamente un 6% en peso seco, del cual el 1-2 % son ácidos grasos altamente poli-insaturados (PUFAs). En particular esta cianobacteria es rica en ácido γ -linoleico (Macera *et al.*, 2005). Se ha de tener en cuenta que tanto su cantidad como composición varía en función de las condiciones de cultivo, principalmente de la iluminación recibida y de la concentración de nitrógeno del cultivo. Cuando la iluminación es escasa, aumenta el contenido de lípidos en el interior de las células, como reserva de energía.

Tabla 1.5 Composición en lípidos principales en *Arthrospira* sp. en % de ácidos grasos y lípidos totales (según Maza *et al.*, 2011).

Lípidos	Nº C	Fórmula	%
Saturados	N:0		52,725
Ácido Mirístico	14:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	0,724
	15:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ COOH	0,454
Ácido Palmítico	16:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	46,784
Ácido Margárico	17:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	0,487
Ácido Esteárico	18:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ COOH	1,154
	19:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	0,473
Ácido Araquínico	20:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₇ COOH	1,301
Ácido Behénico	22:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₉ COOH	1,340
Monoinsaturados	N:1		16,662
Ácido Sapiénico	16:1	CH ₃ (CH ₂) ₈ CH=CH(CH ₂) ₄ COOH	1,630
Ácido Palmitoleico	16:1	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	3,497
Ácido Oleico	18:1	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	7,210
Ácido Eláico	18:1	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	0,210
Poli-insaturados	N:n		34,613
Ácido Linoleico	18:2	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	16,007
Ácido α -Linolénico	18:3	CH ₃ CH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	17,028
Ác, 11,14 Eicosanocio	20:2	CH ₃ (CH ₂) ₉ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₄ COOH	0,077
Ácido Araquidónico	20:4	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₃ COOH	1,501

1.2.4.3 Glúcidos

Arthrospira sp. tiene un contenido en azúcares de 8-14% del peso seco principalmente en forma de polisacáridos de los que sus monómeros mayoritarios son glucosa, galactosa, manosa y ribosa (Tabla 1.6).

Tabla 1.6 Composición en carbohidratos de *Arthrospira* sp. (% de Carbohidratos), según Pignolet *et al.* (2012) y Cohen *B.* (2014).

Carbohidratos	Pignolet 2012	Cohen 1997
Galactosa	14,9	8,2
Xilosa	14,3	4,5
Glucosa	13,2	7,5
Fructosa	13,2	3,3
Ramosa	3,7	17,1
Arabinosa	1,0	
Manosa	0,3	1,9
Ac. Galacturónico y Glucurónico	13,5	
Glicerol		7,4
Metil-hexosa		8,1
Ribosa		8,1

Pigmentos y vitaminas: al tratarse de un organismo foto-autótrofo la *Arthrospira* sp. contiene elevadas concentraciones de pigmentos. Los pigmentos ayudan a sintetizar muchas enzimas necesarias para regular el metabolismo, y son importantes antioxidantes. *Arthrospira* sp. contiene carotenoides (0,37% en peso), así como clorofila, y ficocianina (Figura 1.7). Este último pigmento es un complejo proteico que forma hasta un 20% del peso. Este compuesto solo se encuentra en las denominadas algas verde-azuladas (Henrikson, 1989). *Arthrospira* sp. contiene vitaminas: B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina), B₃ (niacina), B₆ (piridoxina), B₁₂ (cianocobalamina), C y E, entre otras.

Figura 1.7 Estructura química de la ficobilina presente en la ficocianina. Zheng *et al.*, 2013.

Tabla 1.7 Composición pigmento-vitámica de *Arthrospira* sp. (mg/kg MS). Datos de IISAM 2012, USDA 2017. Necesidades en la dieta de Tilapia (Fitzsimmons, 1997).

Vitaminas de la <i>Arthrospira</i> sp. (MS)	IISAM 2012 (.../kg)	USDA 2017 (.../kg)	Fitzsimmons 1997Nec.Tilapia(.../kg)
Vitamina A (retinol)		290 µg	4000-UI
Vitamina B1 (tiamina)	55 mg	23,8 mg	11 mg
Vitamina B2 (riboflavina)	40 mg	36,7 mg	20 mg
Vitamina B3 (niacina)		128,2 mg	...
Vitamina B5 (ácido pantoténico)	11 mg	34,8 mg	35 mg
Vitamina B6 (piridoxina)	3 mg	6,4 mg	11 mg
Vitamina B12 (Cianocobalamina)	2 mg		0.01 mg
Vitamina C (ácido ascórbico)		101 mg	375 mg
Vitamina E (α-tocoferol)	190 mg	5 mg	66-UI
Vitamina K (fitomenadiona)		255 mg	4,4 mg
Inositol	350 mg		...
β-caroteno	1.700 mg	342 µg	...
α-caroteno	Trazas		...
Biotina (H)	0,4 mg		...
Ácido Fólico	0,5 mg		5 mg

Minerales: Durante su desarrollo las microalgas absorben y “quelan” de forma natural muchos oligoelementos (Henrikson, 1989). De esta forma los minerales son mejor asimilados por el organismo humano. Evidentemente el contenido mineral de *Arthrospira* sp. varía según el medio de cultivo (Tabla 1.8), siendo una fuente de hierro de calidad y fácilmente asimilable. Es de uso aconsejable en dietas vegetarianas y veganas.

Tabla 1.8 Composición mineral de tipo de *Arthrospira* sp. (mg/kg MS). IISAM (2012) y USDA (2017). Necesidades en la dieta de Tilapia (Fitzsimmons, 1997).

Minerales de la <i>Arthrospira</i> sp. (MS).	IISAM 2012 (mg/kg)	USDA 2017 (mg/kg)	Fitzsimmons 1997 Nec.Tilapias (mg/kg)
Calcio	1.045 - 1.315	1.200	...
Hierro	475 - 580	285	150
Magnesio	1.410 - 1.915	1.950	500
Manganeso	18 - 25	19	13
Fósforo	7.617 - 8.942	1.180	7000
Potasio	13.305 - 15.400	13.630	...
Sodio	275 - 412	10.480	...
Zinc	27 - 39	20	20

Su contenido en ácidos nucleicos puede ser un problema para los pacientes con propensión a sufrir gota.

1.2.5 *Aplicación de Arthrospira sp. en animales*

Uno de los problemas principales en el uso de microalgas en la producción animal lo encontramos en los costes de producción, sobre todo si los comparamos con otras fuentes de alimentación animal. Esto hace que su uso sea poco práctico en muchas operaciones de producción animal a gran escala (Becker, 2007). Sin embargo, el coste de *Arthrospira* sp. se puede reducir con la mejora y evolución de los medios de producción (Shimamatsu, 2004; Raoof *et al.*, 2006; Peiretti y Meineri, 2011). Además, cabe destacar que la investigación de la utilización de *Arthrospira* sp. en la producción animal y su impacto en la calidad del producto nos permite comprender cada vez más los aspectos prácticos de su uso.

1.2.5.1 **Avicultura**

En avicultura algunos investigadores han demostrado una mejora en la salud de los pollos cuando se incluye en la dieta *Arthrospira* sp. en niveles del 1%, observando mayor resistencia a las enfermedades (Venkataraman *et al.*, 1994; Qureshi *et al.*, 1996; Al-Batshan *et al.*, 2001). Estos estudios también evidencian, que *Arthrospira* sp. mejora la calidad de los productos derivados de la producción avícola.

En gallinas ponedoras encontramos referencias de un aumento en el color de la yema de huevo (naranja) (Ross y Dominy, 1990; Sujatha y Narahari, 2011; Saxena *et al.*, 1983). Hallazgos similares se han encontrado en ensayos con codornices japonesas (Ross *et al.*, 1994). El efecto de *Arthrospira* sp. sobre el color de la yema es el resultado de su alto contenido de zeaxantina, xantofilas y otros pigmentos carotenoides, particularmente el β -caroteno, que se acumula dentro de la yema (Anderson *et al.*, 1991; Takashi, 2003). Se ha encontrado que estos mismos compuestos también se acumulan en el tejido muscular de los pollos.

1.2.5.2 **Porcino**

En porcino, si analizamos la relación que tiene la suplementación con *Arthrospira* sp. en los reproductores, Granaci (2007) encontró que los verracos que recibían un extracto de *Arthrospira* sp. tenían una mayor calidad de esperma en general que sus contrapartes no suplementadas en términos de aumento del volumen de esperma en un 11%, y motilidad y viabilidad posterior al almacenamiento en un 5%.

1.2.5.3 **Rumiantes**

El rumen de los rumiantes les hace especialmente adecuado para la utilización de algas en la dieta. *Arthrospira* sp. se puede usar en rumiantes en niveles de hasta un 20% del alimento total, niveles superiores a los recomendados para otras microalgas como *Chlorella* o

Scenedesmus obliguggs (Gouveia *et al.*, 2008). Algunos estudios muestran que *Arthrospira* sp. aumenta la producción de proteína cruda microbiana y reduce su tiempo de retención dentro del rumen (Quigley y Poppi, 2009). Además, aproximadamente un 20% de *Arthrospira* sp. suministrada no es degradada por el rumen y puede ser digerida directamente por el abomaso (Quigley y Poppi, 2009; Panjaitan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Otro dato interesante es que se puede administrar en rumiantes en suspensión acuosa de la microalga, siendo aceptada por estos (Panjaitan *et al.*, 2010), lo que reduce uno de los factores más costosos de su producción, el secado.

En recientes investigaciones, se atribuye a la suplementación con algas la capacidad de seleccionar la población de protozoos ruminales, influyendo de esta forma en la proporción de ácidos grasos de cadena corta (Boeckaert *et al.*, 2008). Shimkiene *et al.* (2010) han demostrado que los corderos de ovejas gestantes que reciben *Arthrospira* sp. nacen con más peso (hasta 4,07% más). En corderos, Bezerra *et al.* (2010) encontraron que los corderos que reciben *Arthrospira* sp. tienen pesos vivos y ganancias medidas diarias (GMD) más altas que otros corderos que no reciben.

1.2.5.4 Ganado Lechero

Arthrospira sp. tiene resultados positivos en la productividad en ganado lechero. Estudios como los de Kulpys *et al.* (2009) muestran que las vacas que recibían *Arthrospira* sp. en la dieta tenían un aumento de hasta un 21% en la producción de leche. Además, Simkus *et al.* (2007, 2008) reflejaron un aumento en la grasa láctea (entre 17.6% y 25.0%), proteína de la leche (hasta 9.7%) y lactosa (hasta 11.7%). El contenido de ácidos grasos saturados de la leche disminuyó y los ácidos grasos monoinsaturados y PUFA's aumentaron cuando las vacas recibieron *Arthrospira* sp. (Christaki *et al.*, 2012). El consumo de *Arthrospira* sp. también se ha asociado con disminuciones significativas en el recuento de células somáticas de la leche (Simkus *et al.*, 2007), mejorando así el valor de la misma. Además, se ha encontrado que las vacas lecheras que reciben *Arthrospira* sp. tienen una mejor condición corporal (8.5-11%) (Kulpys *et al.*, 2009).

1.2.5.5 Acuicultura

Las algas son parte de la dieta básica de los ecosistemas acuáticos. En acuicultura las microalgas se usan muy habitualmente, principalmente para la producción de larvas y juveniles y peces, así como para elevar el zooplancton requerido para la alimentación de animales juveniles. *Arthrospira* sp. se usa en cantidades sustanciales (más de 100 t anuales)

como alimentación de peces y camarones, e incluso se pueden proyectar mercados más grandes si los costos de producción pudieran reducirse. Aunque, del efecto y rendimiento de *A. platensis* en acuicultura se retomará en más en profundidad en posteriores capítulos de la tesis, se puede mencionar a priori algunos ejemplos.

Varios estudios han considerado los efectos de la suplementación con *A. platensis* (menos del 10% de la dieta) en los peces. En peces de cola de espada roja (*Xiphophorus helleri*) a los que se les administró 8% de *A. platensis*, aumentó el consumo de alimento, el peso corporal, la longitud, el peso de las gónadas y el número de crías (James *et al.*, 2006). En gourami de tres puntos (*Trichopodus trichopterus*), Khanzadeh *et al.* (2016) encontraron que 5% de *A. platensis* (reemplazo de la harina de pescado) mejora el consumo de alimento, la tasa de conversión alimentación (FCR) y el índice gonadosomático. Truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) suplementadas con un 10% de *A. platensis* (una fuente de pigmento natural) deposita más carotenoides en el tejido muscular (Teimouri *et al.*, 2013). La adición de *A. platensis* a la alimentación de guppies (*Poecilia reticulata*) mejora su tolerancia a una toxina (rojo de metilo), que se manifiesta por una reducción notable de los efectos citotóxicos en los glóbulos rojos (Sharma *et al.*, 2005).

1.2.5.5.1 *Arthrospira* sp. en *Oreochromis* sp.

En *O. niloticus*, cuando se agrega 0,5-1-2% de *A. platensis* al alimento se mejora su sistema inmunitario (Abdel-Tawwab y Ahmad, 2009), tiene efectos antioxidantes y promueve el crecimiento (Takeuchi *et al.*, 2002; Belal y El-Hais, 2012), probablemente debido a su alto contenido en xilosa, fructosa, galacturónico y ácido glucurónico (todos los cuales se consideran prebióticos) y otros compuestos como los ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$, el β -caroteno o la ficocianina (Pingnolet *et al.*, 2012), que tienen actividad antiviral (Chamorro *et al.*, 2002). Se han utilizado diferentes estrategias para modificar el microbiota intestinal utilizando prebióticos en *Oreochromis* sp. (Haygood y Jha, 2016).

Según Belay *et al.* (1996), desde el punto de vista de la relación coste-efectividad, la aplicación más prometedora puede ser sus efectos de mejora inmunitaria y, a través de esto, sus propiedades antivirales y antibacterianas, ya que estos efectos se presentan a concentraciones suplementarias muy bajas en los alimentos. Los animales jóvenes a menudo tienen un sistema inmune deficiente durante las primeras semanas de vida.

1.3 TILAPIA DEL NILO "*OREOCHROMIS NILOTICUS SP.*"

Con el nombre de Tilapia se conoce a un grupo de peces originarios de regiones tropicales y subtropicales de África (Figura 1.8), en las que se dan las condiciones favorables para su reproducción y crecimiento. Prefiere aguas someras y cálidas de entre 28 y 36°C, siendo su límite de temperatura inferior de 11-12°C y superior de 42°C. Es un pez omnívoro que se alimenta de fitoplancton, plantas acuáticas, pequeños invertebrados, fauna béntica, desechos y capas bacterianas asociadas al detritus (Beveridge y Baird, 2000). La tilapia ha sido catalogada como uno de los cultivos acuícolas más prometedores y de mayor futuro para la acuicultura, debido principalmente a altísima adaptabilidad y a su velocidad de crecimiento (Gramados *et al.*, 2002; Green, 1995).

Figura 1.8 Distribución geográfica de las poblaciones originarias de *O. niloticus* y sus sub-especies (Beveridge y Baird, 2000; FAO, 2017).

Según la descripción de la FAO, *O. niloticus* se describe como un pez de cuerpo comprimido donde la profundidad del pedúnculo caudal es igual a su longitud. Durante la época de desove, las aletas pectoral, dorsal y caudal adquieren una coloración rojiza y la aleta dorsal unas tonalidades más oscuras con líneas negras (Figura 1.9).

Figura 1.9 Diferencia de coloración de *O. niloticus* linnaeus, 1758 (Cichlidae). Arriba se puede ver los colores pardo-grisáceos normales de la tilapia salvaje. Debajo se puede observar los colores verde-rojizos y negros correspondientes a la librea de apareamiento.

El género *Oreochromis* sp. ha sido introducido en aguas naturales de un gran número de países tropicales y subtropicales de América central, Sudamérica y Asia. La distribución geográfica actual se puede inferir observando los datos oficiales de su pesca (Tabla 1.9), que predomina en los países de origen, como Egipto, Kenia o Sudan, seguido por países tropicales donde su implantación temprana y la climatología favorecen su crecimiento, como Indonesia, Tailandia, Kenia o Malí.

Tabla 1.9 Estadística pesquera de *O. niloticus* en los países de máxima captura. Datos en toneladas (FAO Stast, 2017).

País	2010	2011	2012	2013	2014
Egipto	130.330	120.220	102.186	102.802	107.956
Indonesia	17.345	22.534	28.484	27.332	28.480
Tailandia	32.645	35.203	33.491	19.982	28.100
Kenia	24.572	38.153	25.261	25.071	25.999
Malí	30.000	32.400	21.342	29.826	22.415
Sudán	0	0	18.000	18.000	18.000
Ruanda	443	938	1.377	1.173	2.002
El Salvador	0	0	850	790	831
Burundi	41	24	44	28	15
Rep. Djibuti	5	6	10	10	10
Ecuador	22	43	5	7	3

1.3.1 Producción mundial de *Oreochromis niloticus*

Según los informes de la FAO (FAO Stats, 2017) la producción mundial de tilapia sigue el ritmo ascendente (Figura 1.10), con China en la cabeza en 2014 con 1278483 t, mientras que Egipto, el país de origen, reportó una producción cercana a las 760000 t en ese mismo año. Por otro lado, Indonesia supero la producción de Egipto alcanzando casi el millón de toneladas. Tailandia y Filipinas oscilan entre las 200000 t y 150000 t, respectivamente. España se sitúa en un modesto puesto 66º, con una producción que ronda las 10 t anuales (Tabla 1.10).

Tabla 1.10 Producción mundial de tilapia cultivada en toneladas en el periodo comprendido entre el 2010 y el 2014. Datos obtenidos de FAO Fish-Stats (2017).

País (País)	2010	2011	2012	2013	2014
China	998.890	1.080.800	1.164.733	1.243.317	1.278.483
Indonesia	429.053	567.077	695.063	914.168	999.694
Egipto	557.049	610.617	768.752	635.843	759.601
Tailandia	179.240	155.544	203.029	197.595	188.907
Filipinas	168.399	166.429	164.582	168.872	169.467
Uganda	31.500	28.101	52.303	47.841	53.093
Ghana	9.424	18.200	26.400	30.900	36.900
Honduras	16.455	20.000	20.500	22.600	29.750
Rep. Dem. Pop. Lao	20.580	24.000	25.500	27.000	27.000
Ecuador	47.733	48.000	39.818	23.920	23.900
España (66º)	0	0	0	9,1	10,38
Total	2.537.491	2.809.773	3.261.192	3.425.121	3.670.259

Figura 1.10 Pesca, producción y valor en USD, de tilapia del Nilo desde 1950. Datos obtenidos de FAO Fish-Stats (2017).

Estados Unidos es un gran importador de esta especie, siendo el tercer producto acuícola más importado por ese país, después del camarón y el salmón del Atlántico. En China, la mayoría de la producción se destina a consumo interno. Un pequeño porcentaje se exporta a Estados Unidos y en menor medida, a otros destinos. Ha demostrado ser un producto de gran acogida en el mercado latinoamericano, siendo uno de los pescados más consumidos en El Salvador y Colombia.

En España su consumo y comercialización aun es baja, pero poco a poco aparece en los menús de escuelas, hospitales y universidades. Los principales productores del país se encuentran en el sur y la costa levantina, donde los rangos estacionales de temperatura son buenos para su producción. Las empresas más importantes en España son Valaqua (Valencia), Tilamur (Murcia) y Bravía (Córdoba).

1.3.2 Características nutricionales de *Oreochromis niloticus*

La composición química de los peces varía considerablemente entre especies, individuos, así como del sexo, la edad, época del año y nivel de alimentación. Los principales constituyentes de la carne de tilapia en término medio se expresan en la tabla siguiente (Tabla 1.11).

Tabla 1.11 Composición bioquímica de la *O. niloticus* (100 g) según Dale *et al.* (2004).

Composición Tilapia	En 100 g MS
Energía	290 Kcal
Carbohidratos	0 g
Grasas	11,74 g
Saturadas	4,49 g
Mono-insaturadas	5,33 g
Polinsaturadas	1,91 g
Proteínas	54,80 g
Agua	7,40 g

Las proteínas del pescado contienen todos los aminoácidos esenciales y de la misma manera que las proteínas de la leche, los huevos y la carne de mamíferos, tienen un valor biológico muy alto (Tabla 1.12).

Tabla 1.12 Composición en aminoácidos de la *O. niloticus* (g/100g) de Dale *et al.* (2004) vs, patrón nutricional FAO (2011).

Aminoácidos	FAO 2011	Promedio (g/100 g) ± SD
Isoleucina	3,20	1,72 ± 0,12
Leucina	5,90	3,18 ± 0,12
Lisina	4,50	3,37 ± 0,13
Metionina	3,10 ¹	1,18 ± 0,09
Arginina	5,90 ²	3,67 ± 0,13
Treonina	3,10	2,03 ± 0,08
Triptófano	0,85	0,39 ± 0,03
Valina	4,30	2,19 ± 0,15
Cisteína	...	0,36 ± 0,03
Histidina	2,00	1,07 ± 0,06

Incluye cisteína¹, incluye tirosina².

Los lípidos presentes en las especies de peces óseos pueden ser divididos en dos grandes grupos: los fosfolípidos y los triglicéridos. Algunos peces contienen ceras esterificadas como parte de sus depósitos de grasa (Tabla 1.13).

Tabla 1.13 Composición en ácidos grasos de la *O. niloticus* (g/100g). Dale *et al.* (2004).

Lípidos (Principales)	Nº C	Fórmula	g/100 g MS
Saturados	N:0		10,6
Ácido Mirístico	14:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	3,1
Ácido Estearico	18:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ COOH	7,5
Monoinsaturados	N:1		41,5
Ácido Palmitoleico	16:1	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	6,1
Ácido Oleico	18:1	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	35,4
Polinsaturados	N:n		
Ácido Palmítico	16:2	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	25,7
Ácido Linoleico	18:2	COOH-(CH ₂) ₇ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₄ -CH ₃	11,9
Ácido Araquidónico	20:4	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₃ COOH	2,0
Omega 3 totales	N:3	...	3,7

Respecto a los minerales, la carne de pescado se considera una fuente particularmente valiosa de calcio y fósforo, así como también de hierro y cobre. Los peces de mar tienen un alto contenido de yodo (Tabla 1.14).

Tabla 1.14 Composición en minerales de la *O. niloticus* (g/100 g). Dale *et al.* 2004.

Minerales	%
Calcio	8,4
Sodio	0,38
Magnesio	0,15
Fósforo	4,1
Potasio	0,38
	ppm
Cobre	9,0
Zinc	67,5
Manganeso	13,9
Hierro	187,0

1.4 EFECTO DE *ARTHOSPIRA PLATENIS* EN *OREOCROMIS NILOTICUS*

En su hábitat natural *O. niloticus* se alimenta principalmente de algas (incluyendo cianobacterias) e invertebrados. *A. platensis* es rica en vitamina B12 y β -caroteno (20 veces más que las zanahorias) y tiene una alta concentración de aminoácidos esenciales, ácidos grasos ($\omega 3$ y $\omega 6$) y minerales (Takeuchi *et al.*, 2002; James *et al.*, 2006), una gran cantidad de proteína (aproximadamente 68% en peso seco, Phang *et al.*, 2000), así como propiedades antioxidantes. Por todas estas razones es comúnmente utilizado como un suplemento natural en alimentos para animales, incluyendo alimentos para peces (McCarthy, 2007).

1.4.1 Supervivencia, crecimiento, y calidad de la carne

El principal cometido de la acuicultura es proveer de proteína de gran calidad, al menor coste posible. Además, como cualquier tipo de producción el control y mejora del crecimiento y la calidad es un concepto fundamental.

1.4.1.1 Supervivencia

El proceso de alevinaje es un momento delicado y sensible en cualquier producción piscícola¹²⁴ Una vez que los peces superan la fase de juvenil la mortalidad desciende por debajo del 10% (Meyer, 2004). Esto se debe en parte a que durante las fases tempranas son más sensibles a los parásitos (coccidios, trichodionidos ó trematodos), a las enfermedades bacterianas (*Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium culumnaris* ó *Edwarsiella tarda*), así como a los cambios ambientales. Además de esto, se ha de tener en cuenta que los ritmos de crecimiento entre individuos son distintos. Se establecen jerarquías, y pueden darse episodios de canibalismo, reduciendo la supervivencia de los alevines más débiles (Berrios y Snow, 1983). Todo esto produce un alto número de bajas durante esta fase crucial.

Estudios suplementando *A. platensis* en la alimentación de peces han demostrado que *A. platensis* actúa como inmunoestimulante, aumentando la resistencia de los peces expuestos al patógenos como *Aeromonas hydrophila* (Watanuki *et al.*, 2006). Disminuir este número de bajas significa incrementar la eficiencia de las producciones y la inclusión de algas como la *A. platensis* puede resultar beneficiosa como complemento vitamínico y proteico. Estos nutrientes pueden mejorar la condición de los peces más débiles, mejorando su respuesta al estrés.

1.4.1.2 Crecimiento

El crecimiento de los peces depende de varios factores como la temperatura, densidad, tipo y tasa de alimentación, y calidad del agua (Villarroel *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2011; Meyer, 1999). En *O. niloticus*, la mayor tasa de crecimiento la presentan los machos de 6 a 8 meses, el crecimiento promedio de estos es de 18 a 25 cm, con un peso de 150 a 300 g, con unas tasas de crecimiento de 7,66 g/semanales (García *et al.*, 2012).

Para estimar el crecimiento se cuenta con varios parámetros productivos. Los más utilizados son la ganancia media diaria, el factor de condición corporal o el índice de condición alimenticia. Algunos estudios con *Arthrospira* sp. como suplemento en peces encontraron que *A. platensis* actúa como promotor del crecimiento (Nandeeshha *et al.*, 2001; Takeuchi *et al.*, 2002; Abdel-Tawwab y Ahmad, 2009; Gómez *et al.*, 2012).

1.4.1.3 Calidad de la carne

Según la FAO (2017), la calidad de la carne se define generalmente en función de su calidad composicional (coeficiente magro-graso) y de factores de palatabilidad tales como su aspecto, olor, firmeza, jugosidad, ternura y sabor. La calidad nutritiva de la carne es objetiva, mientras que la calidad “como producto comestible”, tal y como es percibida por el consumidor, es altamente subjetiva.

La calidad de la carne está influida por varios aspectos, en el que el más importante es la dieta. Pero también, está influido por el manejo y las características ambientales. Algunos investigadores como Takeuchi *et al.* (2002) o Abdel-Tawwab y Ahmad (2009) mostraron que los peces alimentados con *A. platensis* tenían un mayor contenido de proteína, un mayor contenido de lípidos polares y un menor contenido de cenizas que los peces alimentados con la dieta comercial.

La calidad de la carne se puede valorar desde un punto de vista distinto a la composición bioquímica. Para ello se cuenta con una serie de parámetros que están interrelacionados entre sí, y que afectan al proceso de carnificación, o de maduración de la carne. En la figura (1.11) se presentan los principales procesos bioquímicos que se dan durante la fase *post-mortem*, así como los indicadores de respuesta al estrés asociados a la calidad de la carne.

Figura 1.11. Procesos bioquímicos en peces durante la fase *post-mortem* y principales indicadores de calidad de la carne (adaptado de Poli *et al.* (2005)).

La energía necesaria para la actividad muscular de un animal vivo se obtiene de los glúcidos, principalmente glucógeno, presentes en el músculo. En un animal en buen estado y relajado, el nivel de glucógeno muscular es elevado. Tras el sacrificio, este glucógeno se transforma en ácido láctico por la respiración anaerobia del músculo. Esto provoca que la carne y el músculo se vuelvan rígidos, apareciendo el fenómeno denominado "*rigor mortis*". Los niveles adecuados de ácido láctico son necesarios para producir carne de buena calidad, tierna, con buen color, sabor y textura. Cuando el animal es estresado antes del sacrificio, se consume parte o todo el glucógeno disponible en el músculo, lo que reduce la producción de ácido láctico.

Si tiene lugar una gran acumulación previa al sacrificio de lactato en el músculo, principalmente debida a una respuesta del estrés, el pH de la carne descenderá rápidamente tras el sacrificio. Si el músculo sufre esta rápida caída de pH la acumulación de ácido láctico es más rápida y el establecimiento del rigor mortis sucede antes (1-4 h *post-mortem*).

De forma contraria, si el animal presenta un agotamiento de sus reservas de glucógeno previo al sacrificio, el pH no va a descender lo suficientemente rápido tras el sacrificio porque no habrá una suficiente producción de ácido láctico.

En un animal tranquilo, que no está sometido a una situación de estrés, la creatina fosfato va a ayudar a regenerar los niveles de ATP en el musculo. Sin embargo, cuando el animal ha sido expuesto a un estímulo estresante previo al sacrificio, la creatina fosfato va a ser consumida, presentando niveles inferiores o ningunos de creatina fosfato en el musculo tras sacrificio. Debido a esta situación el ATP va a tener que ser generado desde otra fuente. Esta nueva fuente va a ser principalmente glucógeno, ya que es el mayor depósito de energía en el musculo, que va a ser metabolizado para suplir la falta de ATP y en consecuencia mantener los músculos en un estado de *pre-rigor*.

1.4.1.3.1 Rigor mortis

El *rigor mortis* es un proceso por el cual se produce una reducción de flexibilidad del musculo, tras la muerte que se corresponden a los procesos bioquímicos explicados anteriormente. Inmediatamente tras la muerte los músculos son blandos y muy flexibles, *pre-rigor mortis*. Con el transcurso del tiempo, al cabo de unas horas (1-6h), los músculos comienzan a endurecerse y ya no son capaces de moverse. Transcurridas unas cuantas horas más, comienza el proceso de carnificación. Las proteasas del musculo son liberadas y comienzan a digerir las fibras musculares devolviendo la flexibilidad a los músculos que pierden esta rigidez (*post-rigor*). Este proceso depende de varios factores, entre los que se encuentra, la especie, el tamaño del pez, el manejo pre-sacrificio, la temperatura de conservación o la alimentación. Las microalgas y sus componentes pueden mejorar la composición bioquímica de la carne de pescado, y por lo tanto interferir en este proceso.

En *Oreochromis* sp. alimentado con *Arthrospira* sp. varios estudios han analizado los cambios en la textura de la carne, la composición de las proteínas y los ácidos grasos (Lu *et al.*, 2003; El-Sheekh *et al.*, 2014). Pero se sabe menos sobre el efecto de esta cianobacteria sobre la evolución del *rigor mortis*.

1.4.1.3.2 pH muscular

Inmediatamente después del cese de la circulación de la sangre en el organismo, el glucógeno almacenado es degradado anaeróbicamente y se acumula ácido láctico en el musculo (Grigorakis *et al.*, 2003), lo que provoca un descenso de pH muscular. A mayor concentración de glucógeno muscular pre-sacrificio, más bajo será el pH y viceversa (Bermejo-Poza *et al.*, 2015). El estado nutricional del pez, así como el nivel de respuesta al estrés, tienen una gran influencia sobre este parámetro de calidad.

1.4.1.3.3 Color de la carne

La industria de la acuicultura, especialmente en las producciones de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el salmón (*Salmo salar*), el color de la canal es un importante indicador de calidad para el consumidor. El color de la carne puede modificarse a través de la alimentación. La Unión Europea está preocupada por el uso de ciertos pigmentos utilizados en la acuicultura (Penninks *et al.*, 2017). Las microalgas se muestran como una alternativa viable utilizada en diferentes especies. En *O. mykiss* y *S. salar* el uso de pigmentos, astaxantina, procedentes de microalgas (*Haematococcus pluvialis*) se usan habitualmente en la formulación de piensos, para intensificar el color asalmonado en carne de estos peces (Sommer *et al.*, 1991, 1992; Baker *et al.*, 2002).

En este mismo sentido, *A. platensis* se utiliza en la cría de las mascotas para avivar los colores de aves exóticas y peces de acuario. Pero se sabe menos acerca del efecto que esta cianobacteria y sus pigmentos pueden tener en el color de la canal, de los peces y animales de abasto.

1.4.2 Bienestar animal y Estrés

El concepto de bienestar animal incluye tres elementos importantes que tener en consideración. El primer punto es el correcto funcionamiento del organismo, lo que entre otras cosas supone que los animales estén sanos y bien alimentados. En segundo lugar, el estado emocional del animal, incluyendo la ausencia de emociones negativas tales como el dolor y el miedo crónico, y la posibilidad de expresar algunas conductas normales propias de la especie (Fraser *et al.*, 1997). Estos tres principios no son necesariamente contradictorios, sino que en muchas ocasiones son complementarios (Mendl, 2001). Cuando se cumplen estos requisitos el animal está en armonía con el ambiente que lo rodea (Broom, 1986; Mancera y del Rio, 2005). Aunque las condiciones de bienestar pueden variar entre individuos y en el tiempo, ya que un animal no se encuentra en el mismo estado de bienestar todo el tiempo (Curtis, 1985).

Según Ellis *et al.* (2004) se respeta el bienestar cuando se cumplen las "cinco Libertades" propuestas por la Unión Europea para asuntos sobre el bienestar animal. (FAWC, 1996).

- **Libres de hambre y sed:** mediante acceso a agua fresca y comida que garantice la cría de unos animales saludables y vigorosos.
- **Libres de agresiones térmicas y físicas:** aportándoles un alojamiento apropiado, incluyendo protección y un área de descanso confortable.
- **Libres de dolor, lesiones y enfermedades:** mediante la prevención, rápido diagnóstico y tratamiento.
- **Libres para expresar su comportamiento normal:** apretándoles el suficiente espacio, condiciones adecuadas, y en compañía de animales de su misma especie, edad y condición.
- **Libres de temores y angustias:** asegurando unas condiciones que eviten el sufrimiento mental, que les pueda producir un estrés que altere su bienestar.

Estas libertades forman la base para la legislación y regulación del bienestar animal en la cría de animales. Estas leyes y regulaciones van tomando forma según la ciencia va proporcionando más información sobre las respuestas y necesidades etológicas de las respectivas especies en producción.

En acuicultura se deben desarrollar prácticas de manejo que reduzcan el estrés y sus efectos potencialmente dañinos para el pez, ya que las técnicas de producción son cada vez más intensas (restricción de espacio, alteración de factores ambientales, densidad de siembra, entre otros), lo que puede producir efectos no deseados en los animales, causados por el estrés, enfermedades y mermas en la producción. Estas prácticas deben incluir un control continuo tanto del medioambiente de los animales acuáticos como de la condición física de los mismos.

1.4.2.1 Respuesta al estrés de los teleósteos

El estrés puede ser definido como una situación en la cual el equilibrio dinámico de un organismo (estado homeostático) es modificado como consecuencia de la acción de un estímulo intrínseco o extrínseco al animal, denominado agente estresante (Mancera y del Rio, 2005). Estos estímulos pueden ser factores físicos, fisiológicos, conductuales o psicológicos (Dantzer y Mormède, 1983). Según Huntingford *et al.* (2006), los peces pueden sentir el dolor puesto que tienen las vías sensibles para procesar dichos estímulos y mecanismos cerebrales que procesan dicha información y generan respuestas comportamentales que sugieren negativas experiencias subjetivas. En el caso concreto de los peces, fueron los primeros vertebrados en desarrollar una respuesta al estrés, que incluye, interrelaciones entre los ejes relacionados con el sistema nervioso y el sistema endocrino (Barandica y Tort, 2008).

Al ser los peces poiquiloterms y totalmente acuáticos, dependen de la calidad y constancia del medio, requieren una calidad y una temperatura constante, ya que una variación por fuera del rango de confort aceptable dará lugar a estrés, enfermedad y mortalidad, al afectar negativamente a su sistema inmune (Conte, 2004). Aunque el estrés es inherente a la vida, el objetivo del buen manejo es mantener el nivel por debajo del umbral de la manifestación patológica. Las características del agua en el cultivo de peces están afectadas por factores como el tipo de sistema de producción empleado, el entorno medioambiental externo, la densidad animal, y la cantidad y calidad del alimento. En los sistemas de recirculación de agua (RAS) la temperatura del agua y los parámetros como el oxígeno, el dióxido de carbono, la alcalinidad, la dureza y el contenido de los residuos del amoníaco, están contralados mecánicamente o biológicamente para mantener la homeostasis del medio (Masser *et al.*, 2000).

La respuesta al estrés viene dada por una respuesta adaptativa (capacita al individuo a enfrentarse a la situación adversa) y una respuesta no adaptativa (los mecanismos se fuerzan más allá de sus límites, empeorando su salud; Barton e Iwama (1991)). Cuando el agente estresante es puntual, se produce una respuesta aguda, pero si este persiste se produce una respuesta crónica (Pickering, 1998) (Figura 1.12).

Figura 1.12 Esquema de adaptación al estrés según la bibliografía existente.

En los teleósteos podemos diferenciar tres etapas relacionadas con el estrés (Wedemyer, 1996). Se inicia con una respuesta primaria, relacionada con una serie de cambios endocrinos consecuencia del estímulo del estrés (Figura 1.13). En este punto se liberan catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). Estas en la práctica son difíciles de medir y de determinar y su presencia en el torrente sanguíneo es muy baja (Wendelaar, 1997).

Figura 1.13 Esquema de la respuesta al estrés eje CRH-ACTH-Cortisol. Según la bibliografía existente.

Tras la producción de catecolaminas, se estimula el eje hipotálamo-pituitaria-intrarrenal o HPI (Sumpter, 1997). Este comienza con la activación de neurotransmisores cerebrales provocando la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) por parte de las neuronas del hipotálamo. Estas hormonas son transportadas hacia la glándula pituitaria, donde se activará la hormona adrenocorticotrófica (ACTH), que finalmente estimula la producción de cortisol (Sumpter, 1997) en el tejido intrarrenal, equivalente a la corteza renal en mamíferos.

Durante la fase secundaria se producen una serie de cambios consecuencia de la liberación hormonal de la primera fase. Estos cambios se producen a nivel metabólico, fisiológico y tisular, incluyendo por ejemplo el aumento del ritmo cardíaco, por una mayor demanda de oxígeno, una movilización de reservas, y un incremento de la gluconeogénesis.

Posteriormente y como consecuencia de las anteriores, aparece la tercera fase de la respuesta, dando lugar a una disminución del crecimiento y de la resistencia a enfermedades, así como alteraciones en la capacidad reproductora. También se reduce la capacidad de hacer frente a

otras situaciones estresantes adicionales (Wedemeyer, 1996; Wendelaar 1997; Barry *et al.*, 1993; Pickering y Pottinger, 1995).

En un estudio sobre el bienestar en dorada (*Sparus aurata L.*), se mostró que los indicadores de estrés se reducían al suplementar a estas con vitaminas C y E (Ortuño *et al.*, 2003). *A. platensis* es rica en inmunoestimulantes, como las vitaminas C y E. Estos inmunoestimulantes pueden interferir con los ejes responsables del estrés (CRH-ACTH), reduciendo el estrés a lo largo de su respuesta primaria (Fletcher, 1997; Montero *et al.*, 2001).

1.4.3 Como valorar el estrés

1.4.3.1 Parámetros hematológicos

Los parámetros hematológicos han sido ampliamente utilizados como indicadores de estrés en distintas especies animales (Barton, 2011), así como en *O. niloticus* (Tabla 1.15). La existencia de niveles altos de cortisol, glucosa y lactato plasmáticos son utilizadas con frecuencia como indicadores de respuesta de estrés (Mommensen *et al.*, 1999). Estos parámetros están afectados también por la alimentación. Estudios con inclusión de *A. platensis* en la dieta de esturiones (*Huso huso*) (Adel *et al.*, 2016) y en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Teimouri *et al.*, 2013) mostraron una disminución en los niveles de cortisol y triacilglicéridos en sangre de los individuos suplementados.

Tabla 1.15 Cambios en algunos parámetros de la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) después de 24 h de exposición a hipoxia, sobrepoblación y hambre (EL-Khaldi, 2010).

	Cortisol (ng/ml)	Glucosa (mg/100 ml)	LDH (u/l)	CPK (mu/ery ml)
Control	13,41 ± 1,20	105,72 ± 1,18	1971,91 ± 1,38	490,50±1,25
Hipoxia	149,27 ± 1,08	111,00 ± 0,26	2325,20 ± 1,44	260,18 ±1,72
Sobrepoblación	154,12 ± 0,90	124,70 ± 0,33	892,16±1,09	630,00±1,26
Ayuno	136,18 ± 1,04	98,14 ± 0,42	788,62 ±1,38	680,12 ±1,45

1.4.3.1.1 Cortisol

El cortisol (cortisol, Figura 1.14) es una hormona esteroide, producida por la glándula suprarrenal. Es el principal corticosteroide de los peces teleósteos y sus concentraciones se incrementan significativamente a consecuencia a situaciones de estrés (Barton e Iwama, 1991). Su función principal es la de incrementar los niveles de azúcar en sangre, y ayudar al metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas.

Figura 1.14 Molécula de cortisol. (11 β)-11,17, 21-trihidroxipregn-4-eno-3,20-diona

El cortisol disminuye la formación ósea y reduce la respuesta del sistema inmunitario. En estado de estrés crónico puede elevar la concentración a más de 100 ng/ml, para después retornar a niveles normales próximos a 10-20 ng/ml, aunque la causa de la elevación persista (Pickering y Christie, 1981), generalmente antes de 6 a 8 h. Por otro lado, el cortisol está relacionado con el metabolismo lipídico. El cortisol aumenta la lipólisis a nivel de tejido adiposo, músculo rojo e hígado, lo que genera un incremento de los ácidos grasos libres en plasma.

1.4.3.1.2 Glucosa

Una de las respuestas endocrinas al estrés, y como consecuencia de la liberación de cortisol, es el aumento de la glucosa plasmática. Esta puede ser usado como un parámetro alternativo para evaluar la respuesta al estrés puesto que su respuesta es paralela a la del cortisol, aunque normalmente más lenta en el tiempo (Mommsen *et al.*, 1999). Por otro lado, la concentración plasmática está íntimamente relacionado con la dieta y el estado nutricional, por lo que se debe medir en combinación con otros indicadores, según diferentes autores los niveles medios de glucosa se encuentran entorno a los 95 mg/100 ml (El-Khaldi, 2010; Sandoval-Gioet *al.*, 2013).

1.4.3.1.3 Lactato

El lactato es un producto de la degradación del ácido pirúvico, obtenido del proceso de glucólisis. La concentración del lactato en el músculo puede subir súbitamente en situaciones de esfuerzo por la actividad anaeróbica (alta actividad muscular). El lactato puede ser utilizado como un indicador de lucha o de huida y puede estar relacionado con el desarrollo de jerarquías.

1.4.3.1.4 Triglicéridos

La concentración plasmática de triglicéridos también puede ser de utilidad como indicador de respuesta al estrés (Bennett *et al.*, 2007), ya que incrementa su concentración bajo condiciones estresantes cuando el cuerpo necesita energía, encontrándose sus niveles medios en *O. niloticus* en torno a 150 mg/100 ml (Husáinet *et al.*, 1995).

1.4.3.1.5 Actividad enzimática del lactato deshidrogenasa (LDH)

La lactato deshidrogenasa o LDH es una enzima catalizadora de la reacción redox en la que el piruvato es reducido a lactato gracias a la oxidación de NADH a NAD⁺. Esta enzima participa en el metabolismo energético anaerobio, reduciendo el piruvato (procedente de la glucólisis) para regenerar el NAD⁺, que en presencia de glucosa es el sustrato limitante de la vía glucolítica. Niveles elevados de estas enzimas en plasma reflejan un estrés a nivel hepático, renal o muscular (Banaee *et al.*, 2011).

1.4.3.1.6 Creatin fosfoquinasa (CPK)

La enzima CPK cataliza la producción de fosfocreatina a través de la fosforilación de una molécula de creatina, consumiendo una molécula de ATP en el proceso. En la miofibrilla, al inicio de la contracción muscular, la concentración de ADP aumenta a medida que disminuye los niveles de ATP. En esta situación la enzima cataliza la reacción inversa, transfiriendo un radical fosforilo al ADP, restaurando rápidamente la concentración de ATP. Así, la fosfocreatina, por intermedio del ATP, constituye una reserva energética rápidamente utilizable por el músculo esquelético y otros tejidos. Un aumento de esta enzima en sangre expresa un daño muscular por gran actividad, o por algún proceso anormal.

1.4.3.2 Alternativas no invasivas para medir el estrés

Los métodos anteriormente citados para medir el estrés se basan en mediciones costosas, basadas en test de laboratorio, que en ocasiones necesitan el sacrificio del animal, como es en el caso de peces pequeños (alevines benjamines y juveniles). Todos estos métodos a menudo no están rigurosamente vinculados a los resultados de la condición física. Una alternativa es observar la alteración refleja como un signo directo de estrés que puede medirse fácil y rápidamente en natación libre o en peces restringidos que responden a estímulos como la gravedad, la luz, el sonido y el tacto (Davis, 2010).

1.4.3.2.1 *Estrés por Luz*

Maximino *et al.* (2007) demostró que tanto machos como hembras de *O. niloticus* prefieren la oscuridad que la luz. Un trabajo realizado por Fortes-Silva *et al* (2010), concluye que la tilapia del Nilo prefiere salir a alimentarse durante la noche. De manera refleja los peces evitan exponerse a la luz intensa, donde se sienten vulnerable al ataque de un depredador, prefiriendo esconderse en penumbra. Un estudio realizado por Carvalho *et al* (2013) concluye que la intensidad de luz aumentada tiene un efecto acumulativo que aumenta la agresividad y la actividad de la tilapia del Nilo. Algunos estudios demuestran que el color de la luz a la que son expuestos puede producir diferentes reacciones de estrés. Volpato y Barreto (2001) demostraron que la luz azul (250 lux) en *O. niloticus* es preferible a la luz verde o blanca.

1.4.3.2.2 *Estrés por hipoxia*

El oxígeno disuelto (O_2) es un factor fundamental para la vida de los organismos acuáticos. En la naturaleza los peces suelen estar expuestos a cambios en la concentración de oxígeno debido a muchos factores, saltos de agua, temperatura del agua, actividad de microorganismos, densidad de individuos, etc. El oxígeno es un factor importante en el proceso de respiración y el metabolismo de los animales. En los peces de cultivo es común que ellos sean expuestos a cortos periodos de hipoxia o anoxia a causa de fallos en las rutinas de manejo (Valenzuela *et al.*, 2002).

La hipoxia crónica puede influir sobre el sistema inmune (Henrique *et al.*, 2002), haciendo a los peces más susceptibles a infecciones, enfermedades y si esta persiste, causa la muerte. Los bajos niveles de oxígeno también pueden afectar al consumo de alimentos, y a la eficiencia alimentaria, lo que evidentemente afecta a las tasas de crecimiento (Vatsos y Angelidis, 2010).

Los peces tienen distintos mecanismos para enfrentarse a la hipoxia. En truchas expuestas a hipoxia se observó una disminución del consumo de oxígeno y un incremento del número de eritrocitos en circulación (Valenzuela *et al.*, 2002). En general los peces pueden tener tres tipos de respuesta a hipoxia, que están asociadas con el tiempo de exposición. Una inmediata (minutos), produciendo ajustes a nivel fisiológico, como la reducción de la frecuencia cardiaca; una respuesta secundaria (horas), con una respuesta a nivel celular, con un ajuste de los niveles hematológicos relacionados con la captación de oxígeno (Powers, 1980); y una tercera (días), donde se ajustan los mecanismos de homeostasis respiratoria con el proceso de captación de energía, comportamiento y reproducción. Todo este proceso está controlado por el eje hipotálamo-pituitaria-interrenal.

1.4.4 *Microbiota Intestinal*

El sistema digestivo en el género *Oreochromis* sp. es largo, típico de las especies herbívoras y omnívoras. Comienza en la boca, que presenta en su interior dientes mandibulares, continúa con esófago corto y el estómago. El intestino tiene forma de tubo que se adelgaza tras el píloro, diferenciándose en dos partes; una anterior, corta, que corresponde al duodeno, y una posterior más larga, aunque de menor diámetro. El intestino es entre 7-13 veces más largo que la longitud total del cuerpo, característica que predomina en las especies herbívoras. Presenta dos glándulas importantes asociadas con el tracto digestivo: el hígado, que es un órgano grande y de estructura alargada y el páncreas, en forma de pequeños fragmentos redondos y difíciles de observar por estar incluidos en la grasa que rodea a los ciegos pilóricos (Trewavas, 1983).

Tabla 1.16 Eficiencia de asimilación (EA) de las microalgas por la *O. niloticus* en % según Moriarty y Moriarty (1973).

Alga	AE %
<i>Microcystis</i> sp.	70
<i>Anabaena</i>	75
<i>Nitzschia</i>	79
<i>Chlorella</i>	49

La eficiencia de digestión de las células de cianobacterias en *O. niloticus* se encuentra en torno al 75% (Tabla 1.16), mayor que el de otros tipos de microalgas como es el caso de *Chlorella* sp. Esto se debe a que las cianobacterias no contienen una pared de celulosa que proteja el interior de la célula, lo que las hace más digestibles. La digestión y la asimilación de los nutrientes en las tilapias han sido muy estudiadas. Este proceso se realiza en dos etapas, la primera en el estómago donde la acción de las enzimas junto con los ácidos intestinales (disminuye pH estomacal <1), se encargan de romper la estructura de las células eucariotas y procariotas ingeridas (Moriarty y Moriarty, 1973). La segunda fase ocurre en el intestino donde el pH se mantiene en torno 6,8-8,8 y la actividad de la tripsina, quimo-tripsina, amilasa y esterases se intensifica. En *O. niloticus* la digestión de las proteínas se completa en el primer cuarto del intestino.

Para regular la flora interna patógena, durante años ha estado utilizando diferentes tipos de antibióticos, pero su uso está prohibido para la ganadería en Europa desde 2003, (EC) N.º 1831/2003 (European Commission, 2003). Actualmente se intenta afrontar el problema desde

otra perspectiva. En un esfuerzo por reducir el uso de antibióticos en la producción animal intensiva, los investigadores han estado buscando alternativas (El-Haroun *et al.*, 2006), tales como los prebióticos (Mosenthin y Bauer, 2000; Patterson y Burkholder, 2003; Gaggia *et al.*, 2010), que estimulan la actividad del microbiota beneficioso en el intestino, mejorando al mismo tiempo la salud y el crecimiento. El uso de prebióticos es más extendido en animales terrestres que en peces y mariscos, pero varios estudios han demostrado los efectos beneficiosos del uso de prebióticos en la acuicultura (Ringø *et al.*, 2010). Los prebióticos utilizados en los peces incluyen ácidos grasos de cadena corta (Zhou *et al.*, 2009), oligosacáridos no digeribles (fructosa, galactosa, xilosa y glucosa, Grisdale-Helland *et al.* (2008)) y fibra dietética (inulina, oligofructosa o celulosa, Cerezuela *et al.* (2008)). Estos tipos de compuestos se pueden encontrar en microalgas y cianobacterias (O'Sullivan *et al.*, 2010; Evans y Critchley, 2014; De Jesus Raposo *et al.*, 2016; Leal *et al.*, 2017; Lyons *et al.*, 2017).

1.4.4.1 Metagenómica

La aparición de nuevas técnicas de metagenómica supone un punto de inflexión a la hora de entender la colonización y la biodiversidad bacteriana que podemos estudiar en distintos sectores, especialmente en el ámbito intestinal. Anteriormente, el estudio de la flora bacteriana intestinal dependía de los medios de cultivo, lo cual nos daba una visión muy sesgada de la realidad. Esto es debido, entre otros factores, al desconocimiento de los requerimientos nutricionales de determinados grupos y subgrupos de bacterias.

El termino metagenómica puede definirse como el estudio del material genético de una muestra tomada directamente de un nicho, y por tanto eliminando la necesidad de aislamiento del cultivo. La ventaja de estas técnicas de secuenciación es la forma de abordar el problema. Estas técnicas son independientes de medios de cultivos, obteniéndose la colección de todo el material genético, dando una versión más global y detallada de las comunidades bacterianas y su abundancia relativa.

La técnica más común consta de la extracción del material genético de una muestra biológica, y la amplificación de la secuencia gen del RNA ribosomal 16S por PCR. Este gen común en todas las bacterias y tiene partes variables y constantes, lo que permiten la clasificación taxonómica precisa de las bacterias de cualquier comunidad. Con la ayuda de las nuevas herramientas de secuenciación masiva, como el sistema Illumina SBS, permiten conocer y describir en profundidad la composición de la flora bacteriana de cualquier nicho.

En peces estas técnicas han facilitado el estudio del microbiota intestinal. Recientemente, Gajardo *et al.* (2016) han construido un mapa de alta resolución del microbiota intestinal en *Salmo salar* (salmón del atlántico), utilizando Fluorometria Qubit 2.0. Dehler *et al.* (2017) estudiaron los factores ambientales y fisiológicos que influyen en el microbiota intestinal de juveniles de *S. salar*. En *O. niloticus* Giatsis *et al.* (2015), usando pirosecuenciación, estudió el impacto del entorno de crianza sobre el desarrollo del microbiota intestinal (Tabla 1.17).

En peces, varios estudios basados en técnicas metagenómicas han encontrado que diferentes tratamientos afectan el microbiota intestinal. Recientemente, Lyon *et al.* (2016) encontraron que *O. mykiss* suplementado con 5% de microalgas presentaba un microbiota intestinal más diversa que los controles. En *O. niloticus*, Koh *et al.* (2014) encontraron que los peces alimentados con ácidos orgánicos frente a la oxitetraciclina tenían un crecimiento y una resistencia similares al patógeno *Streptococcus agalactiae*, pero las unidades formadoras de colonias eran significativamente más bajas usando ácidos orgánicos. Pedrotti *et al.* (2015) estudiaron en *O. niloticus* el efecto de los carbohidratos en la dieta en el microbiota, pero no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, se ha estudiado poco el efecto de *A. platensis* sobre el microbiota intestinal de *O. niloticus*.

Tabla 1. 17 Cuadro resumen de la metagenómica aplicada en microbiota intestinal de peces.

Referencia	Especie	País/sistema	Kit aislamiento	Cebador F-R (5'-3')		Amplificación	Tax. Programa	Bacterias principales	± %
Fan <i>et al.</i> , 2013	<i>Oreochromis niloticus</i>	Wuxi, China /Ponds	PowerSoil DNA Kit (MO BIO, Carlsbad, CA, USA)	27F	5'-GAG TTT GAT CMT GGC TCA G-3'	QuantiFluor TM-ST fluorometer	QIIME	Fusobacteria	26.0
				338RI	5'-GCW GCC TCC CGT AGG AGT-3'			Protobacteria	25.6
				388RII	5'-GCW GCC ACC CGT AGG TGT-3'			Firmicutes	19.4
Zhai <i>et al.</i> , 2016	<i>Oreochromis niloticus</i>	Wuxi, China /Tanks	E.Z.N.A DNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, US)	515F	5'-BCode-GTG CCA GCM GC CGC GG-3'	Illumina MiSeq	QIIME	Fusobacteria	57.9
				907R	5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3'			Potobacteria	30.7
								Bacterioidetes	11.8
Giatsis <i>et al.</i> , 2015	<i>Oreochromis niloticus</i>	Velden, Netherlands / recirculation aquaculture system y active suspension	DNeasy Blood y Tissue Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)	27F	5'-GAG TTT GAT CMT GGC TCA G-3'	454 pyrosequencing	QIIME	Actinobacteria	43.2
				338RI	5'- GCW GCC TCC CGT AGG AGT-3'			Protobacteria	21.7
				388RII	5'-GCW GCC ACC CGT AGG TGT-3'			Planctomycetes	16.6
Ran <i>et al.</i> , 2015	<i>Oreochromis niloticus</i>	Beijing, China /Tanks	NGS toolkits	349F	5'-GYG CAS CAG KCG MGA AW-3'	Illumina Hiseq2500	UCLUST v1.2.22	Fusobacteria	54.0
				806R	5'-GGA CTA CHV HHH TWT CTA AT-3'			Potobacteria	34.0
Gaikwad <i>et al.</i> , 2017	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Maharashtra, India River, Mula	Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)	27F	5'-AGR GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	Illumina Miseq	QIIME	Fusobacteria	53.2
				519R	5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3'			Protobacteria	26.8
Gaikwad <i>et al.</i> , 2017	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Maharashtra, India Lake, Talegaon Dabhade	Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)	27F	5'-AGR GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	Illumina Miseq	QIIME	Firmicutes	6.9
				519R	5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3'			Fusobacteria	36.8
								Protobacteria	23.6
Ye <i>et al.</i> , 2014	<i>Gizzard shad</i>	Illinois, EEUU river	FastDNA spin kit	27F	5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3'	Fluorometria Qubit 2.1	QIIME	Actinobacteria	15.0
				515F	5'-TAA TGG ATC CAG TGG CGA GCC CTC AGA TCC TGC AT-3'			Cyanobacteria	27.4
				909R				Firmicutes	20.8
Ye <i>et al.</i> , 2014	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Illinois, EEUU river	FastDNA spin kit	27F	5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3'	Fluorometria Qubit 2.1	QIIME	Fusobacteria	11.1
				515F	5'-TAA TGG ATC CAG TGG CGA GCC CTC AGA TCC TGC AT-3'			Cyanobacteria	23.2
				909R				Protobacteria	19.4
Gajardo <i>et al.</i> , 2016	<i>Salmo salar</i>	Sunndalsøra (Norway) RAS	Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)	27F	5'-GAG TTT GAT CMT GGC TCA G-3'	Fluorometria Qubit 2.0	QIIME	Firmicutes	11.4
				338RI	5'- GCW GCC TCC CGT AGG AGT-3'			Protobacteria	63.0
				388RII	5'-GCW GCC ACC CGT AGG TGT-3'			Firmicutes	20.1
Dehler <i>et al.</i> , 2017	<i>Salmo salar parr</i>	West coast Scotlan freshwater commercial cages	Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)		5'-CCT ACG GGN GGC WGC AG-3'	Illumina MiSeq	QIIME	Actinobacteria	5.3
					5'-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC-3'			Firmicutes	50.0
								Protobacteria	23.2
Torrecillas <i>et al.</i> , 2017	<i>Dicentrarchus labraz</i>	Gran Canarias (Spain) /Tanks	Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)	338F	5'-GTG CCA GCM GCC GCG TAA-3'	LIGHTTrum services GATC Biotech AG (Konstanz, Germany)	Squence Scanner v1.0 applied Biosystems®, CA, USA	Firmicutes	7.1
				518R	5'-ATT ACC GCG GCT GTC GG-3'			Actinobacteria	27.6
								Protobacteria	14.4
Huyben <i>et al.</i> , 2017	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Kålarne, Suecia /Tanks	Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)	515F	5'- GTG CCA GCM GCC GCGG TAA-3'	Illumina MiSeq SciLifeLab AB (Estocolmo, Suecia)	QIIME	Firmicutes	75.3
				805R	5'- GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC-3'			Protobacteria	18.8
								Actinobacteria	2.4
Michl <i>et al.</i> , 2017	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Büsum, Germany/acuaria	DNeasy Blood y Tissue Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)	969F	5'-ACG CGH NRA ACC TTA CC-3'	Illumina MiSeq SciLifeLab AB (Estocolmo, Suecia)	QIIME	Protobacteria	52.7
				1406R	5'-ACG GGC RGT GWG TRC AA-3'			Firmicutes	20.7
								Bacterioidetes	17.2

FUNDAMETOS Y OBJETIVOS

2 FUNDAMENTOS Y OBJETIVOS

2.1 FUNDAMENTOS

El objetivo principal de la nutrición animal, más en concreto en acuicultura, es proporcionar una mezcla equilibrada de ingredientes para respaldar las funciones vitales a un costo aceptable. Siguiendo esta línea de pensamiento, por el momento no sería rentable utilizar *A. platensis* (≈ 40 €/kg) como sustituto de la proteína, pero puede ser útil como suplemento nutricional, ya que mejora la eficiencia de la alimentación, la canal calidad y respuesta fisiológica al estrés en varias especies de peces (Takechi *et al.*, 2002; Abdel-Tawwab *et al.*, 2009; Velasquez *et al.*, 2016), contribuyendo estas mejoras a un aumento de la calidad de producto y a la consecución de otros beneficios en la producción que pueden rentabilizarse.

Otro aspecto fundamental que se desea abordar en la nutrición animal es reducir el uso de antibióticos, probióticos y colorantes artificiales utilizados en producción animal intensiva, buscando alternativas en productos naturales como las microalgas, en concreto en *A. platensis*.

2.2 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es analizar el efecto de suplementos de *A. platensis* (espirulina) sobre el crecimiento y bienestar de *O. niloticus* (tilapia). Dentro del objetivo general se abordarán cuatro objetivos más específicos,

1. Determinar el efecto del suplemento de espirulina en el crecimiento y el comportamiento de tilapia juvenil.
2. Determinar el efecto del suplemento de espirulina sobre los parámetros plasmáticos indicadores de estrés en tilapia adulta.
3. Determinar el efecto del suplemento de espirulina en la calidad de la carne de la tilapia.
4. Determinar el efecto del suplemento de espirulina sobre el microbiota intestinal de la tilapia.

MATERIAL Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 INSTALACIONES

Para la realización de los experimentos se contó con la colaboración de varias instituciones, que cedieron las instalaciones para el proyecto. En primer lugar, los invernaderos de la ETSIAAB (Figura 3.1) situados en el Campo de prácticas. En estos invernaderos se cultivaron tanto los alevines de *O. niloticus* como la *A. platensis* necesaria para la realización del estudio. En estas instalaciones también se mantuvieron los peces durante la época invernal, y en ellas se realizaron la prueba de alevines y *two-choices*.

Figura 3.1 Invernaderos de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid situados a 40.446353 N -3.738341 E.

En segundo lugar, se encuentra las instalaciones de acuicultura (Figura 3.2) de la ETSIM donde se realizaron los experimentos de pre-engorde, y los peces pasaban la época estival. Finalmente, en los laboratorios del CIB (Centro de Investigaciones Biológicas) del CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), situadas en la Ciudad Universitaria de Madrid, se llevó a cabo las pruebas de metagenómica.

Figura 3.2 Instalaciones de Acuicultura de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes de Madrid, situadas a 40.450806 N, -3.721382 E.

3.2 CULTIVO DE *ARTHROSPIRA PLATENSIS*

La producción de *Arthrospira* sp. es la base común de todas las pruebas, por lo que se comienza con la metodología usada en su producción. *Arthrospira* sp. puede crecer bajo tres regímenes de alimentación, autótrofa, heterótrofa o mixotrófa, siendo un organismo extremófilo que se desarrolla en condiciones muy alcalinas ($\text{pH} > 9,5$) y en presencia de altas concentraciones de sal ($\text{NaHCO}_3 > 16 \text{ g/L}$).

A la hora de cultivar un alga, o en el caso de una cianobacteria bajo un régimen autótrofo o mixotrófo, es importante un buen diseño del Foto-Bio-Reactor (FBR). Este debe seguir unos criterios de diseño, apuntando a una alta productividad, una eficiente conversión de energía, y al mismo tiempo brindar una fiabilidad y estabilidad. Además, debe ajustarse a los medios y los recursos y herramientas que disponibles. Dentro de estos parámetros se debe diseñar de forma adecuada al cultivo, y no de forma generalista.

En el caso de *A. platensis*, hay varios factores cruciales que se deben tener en cuenta, entre ellos la alta alcalinidad ($\text{pH} > 9$) y salinidad (5-45 g/L) del medio de cultivo (Jourdan, 1999). Esto obliga a utilizar materiales resistentes a la corrosión, evitando materiales metálicos. La iluminación es indispensable para el crecimiento de *Arthrospira*, pero no es recomendable mantener la iluminación de forma continua, ya que un filamento individual de *Arthrospira* no puede soportar una exposición prolongada a la iluminación. Una luz fuerte (pleno sol) puede ser contraproducente en los siguientes casos:

- Cultivo frío, bajo temperaturas inferiores a los 15°C.
- Bajo un exceso de calor, el medio de cultivo puede elevar en exceso la temperatura, si supera en algún momento el rango de tolerancia, el cultivo puede caerse.
- En un cultivo diluido, pues las fibras individuales de *Arthrospira*, pueden estar demasiado tiempo expuestas al sol, sin la protección del sombreado que le proporcionan otros filamentos.
- En un cultivo en condiciones de estrés de cualquier tipo.

3.2.1 Base biológica

Tras considerar distintas especies de *Arthrospira* para el cultivo, finalmente se tomó la decisión de utilizar la cepa *A. platensis* PCC9108 (Imagen 3.3) obtenida de la colección del Instituto Pasteur (Paris, Francia), procedente de China. La decisión se fundamentó en el conocimiento experimental contenido en la literatura que se posee de esta cepa, y por ser la cepa que mejor se adaptó a las condiciones ambientales de laboratorio y de los invernaderos de la ETSIAAB.

Figura 3.3 *A. platensis* PCC9018. Imagen de microscopia óptica, del cultivo utilizado durante los experimentos realizados en 2016.

3.2.2 Manejo del cultivo

El proyecto se inició con un cultivo axénico de *A. platensis*, obtenido a partir de una siembra en agar. Para iniciar el cultivo líquido, de la bacteria cultivada en agar, se transfirió inicialmente a un tubo de ensayo a 10 ml. Posteriormente, el volumen de cultivo se fue aumentando progresivamente hasta alcanzar 1 L (Figura 3.4). Esta fase del cultivo se realizó en el laboratorio. El medio utilizado como el instrumental usado durante esta primera fase, fue esterilizado en autoclave. Con ello, se evita cualquier tipo de contaminación inicial. Para la iluminación en el laboratorio, se utilizó unos tubos fluorescentes que emitían 1000 lux, con ciclos de luz de 16L/8N. Esta decisión fue tomada considerando las recomendaciones de la literatura (Vonshak, 1984; Gitelson, 1996; Jourdan, 1999), que estiman unas necesidades para el cultivo de entre 2000-5000 lux.

El cultivo en fase estacionaria de 1 L se traspasó a un volumen de 5 L. Manteniendo un medio estéril, cuando el cultivo se encuentra a una densidad de 3 g/L en peso húmedo (PH), se siembra en los bio-reactores (BR). En este momento, se consideró el cultivo afianzado, las nuevas adiciones de medio ya no se esterilizaron por autoclave, aunque se seguían tomando medidas para evitar una posible contaminación.

Figura 3.4 Fases de arranque de cultivo de *A. platensis*.

Una vez en el invernadero, para mantener el cultivo sano, semanalmente se llevaron muestras tomadas de los FBR al laboratorio para su control. Un cultivo en que la salinidad o la concentración de *Arthrospira* son muy bajas, puede ser invadido por microalgas como *Chorella* sp. (Figura 3.5) u otras cianobacterias. Las cianobacterias tóxicas como *Anabaena* sp., *Anabaenopsis arnoldii* y *Microcystis* sp., raramente se desarrollan en un cultivo de *Arthrospira* bien cuidado. Con un pH adecuado (pH 10,20) y con alta densidad *Arthrospira* domina el cultivo, evitando el desarrollo de otras especies.

Figura 3.5 Algas que son posibles contaminantes del cultivo de *A. platensis* como *Chlorella* sp. (A), *Anabaena* sp. (B), *Anabaenopsis* sp. (C), y *Microcystis* sp. (D).

Mediante este control, no solo se mantiene el cultivo sano, si no que del cultivo se extrae mucha información. El color, olor, textura del cultivo y sus combinaciones indican el estado y salud del cultivo. La tabla adjunta (Tabla 3.1) fue realizada por la organización Xarxa espirulina (2016) y corroborada por la experiencia adquirida durante el desarrollo de la tesis.

Tabla 3.1 Observaciones en el cultivo de *A. platensis* según Xarxa espirulina (2016) y observaciones propias.

Aspecto general del cultivo	Situación del cultivo	Actuación
<i>A. platensis</i> en grumos u ovillos	Diluido o estrés lumínico	Sombrear Agitar
Capas compactas espesas	Temperatura baja	Revisar la temperatura
Espuma blanca en superficie	Falta de nitratos	Agitar, sombrear y añadir nitratos
	Ruptura de filamentos.	Vigilar agitación,
Ovillos pardos	Depósitos de sales	Revisar las sales del H ₂ O
	y cultivo muerto	Purgar eliminar células muertas
Medio jabonoso al tacto	pH elevado >10.8	Sombrear Añadir CO ₂ , renovar medio

Olor	Situación del cultivo	Actuación
Agradable	Buena salud	no tocar
Amoniacal	Exceso de nitrógeno	Reducir el aporte de nitrato
Sulfuroso	Fermentación	Purgar
Fuerte a cadáver, pescado podrido	Cultivo en mal estado	Purgar, sombrear, revisar cultivo

Observación al microscopio	Situación del cultivo	Actuación
Nº espiras > 10	Falta de hierro	Añadir hierro
Trozos pequeños <3 espiras	Falta de potasio	Añadir potasio
	Sobre agitación	Revisar la agitación

Color	Situación del cultivo	Actuación
Verde-azulado Oscuro	Salud excelente	Se puede reducir el sombreado
Oliva	Buena salud	No tocar
Verde claro amarillento	Fotolisis	Aumentar el sombreado
	Falta de nitrógeno	Añadir medio de cultivo (Nitrato)
	Posible contaminación	Revisar cultivo al microscopio
Verde amarillento + olor amoniac	Exceso de nitrógeno	Reducir el aporte de Nitrato
Amarillo + espuma blanca	Ruptura de filamentos	Vigilar el pH
		Sombrear
		Añadir nitrato potasio
Verde caqui	Falta de nitrógeno	Añadir medio de cultivo (Nitrato)
	Falta de carbono	Sombrear
	Falta de hierro	Añadir hierro
Manchas blancas y azules oleosas	Descomposición superficial	Retirar cultivo enfermo
	Exceso de Insolación	Sombrear
		Mejorar Agitación
Incoloro o pardo amarillento	Cultivo caído/muerto	Revisar cultivo al microscopio

3.2.2.1 Medio de cultivo

Las cianobacterias pueden cultivar en muchos medios tales como: BG11, ASM-1, Z8, DOBLEGA, BBM, AA, KMC, Kn Cg-10, o D (Whitton, 1992), siendo los más idóneos para la *Arthrospira* el medio Zarrouk y el SSM (Gitelson, 1996). Durante la tesis se ha utilizado agua destilada y agua corriente directamente obtenida del Canal de Isabel II en los FBR de producción en los invernaderos. En el caso del agua del Canal, fue previamente desclorada y esterilizada para eliminar contaminaciones no deseadas. El medio de cultivo utilizado se basa en el medio Zarrouk (Zarrouk, 1966), que se compone de tres soluciones (Tabla 3.2), la primera con los macronutrientes, y las otras dos con los micronutrientes, que han de ser preparadas con anterioridad, para añadirlas al medio final a razón de 1 ml/L.

Tabla 3.2 Composición mineral del medio de cultivo de *Arthrospira* sp. Zarrouk (1966).

Macronutrientes	g/L
NaCl	1,00
CaCl ₂	0,04
NaNO ₃	2,50
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01
Na ₂ EDTA	0,08
K ₂ SO ₄	1,00
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,20
NaHCO ₃	16,50
K ₂ HPO ₄	0,50
Micronutrientes (ml/L)	
Solución A5	g/L
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,222
CuSO ₄ H ₂ O	0,079
MoO ₃	0,015
H ₃ BO ₃	2,860
MnCl ₂ 4H ₂ O	1,810
Solución B6	g/L
NH ₄ VO ₃	0,023
KCr (SO ₄) ₂ 12H ₂ O	0,096
NiSO ₄ 7H ₂ O	0,048
Na ₂ WO ₄ 2H ₂ O	0,018
Ti ₂ (SO ₄) ₃	0,040
Co(NO ₂) ₂ 6H ₂ O	0,044

3.2.2.2 FBR utilizados

Se realizaron cultivos a media escala (<20 L) para obtener la biomasa de *Arthrospira* necesaria para las pruebas. Para ello se diseñó un FBR teniendo en cuenta las necesidades del cultivo. Es decir, necesidades de iluminación, agitación y limpieza, así como las labores de manejo. Para ello, se diseñó un FBR sencillo y económico que permitió el cultivo de *A. platensis* en volúmenes de 12 L. Este FBR consta de una funda tubular de plástico, de polietileno de la marca Rajapack, de calidad alimentaria, de 1,2 m de longitud y de 12 cm de diámetro. La bolsa se mantiene termo-sellada por la parte superior, dejando

una entrada para la alimentación y para un tubo de aireación. La parte inferior se termoselló dejando espacio para colocar una espita de plástico, de las usadas en fertiirrigación, que permitía cosechar y purgar el cultivo (i.e., extraer las células muertas y residuos que se generan).

Para obtener la *Arthrospira* necesaria para las pruebas, se utilizaron 20 FBR en paralelo, y 4 FBR madres (Figura 3.6). Los cultivos madre fueron renovados mensualmente con cultivo aséptico obtenido en condiciones de laboratorio. Esto se realizó para renovar periódicamente el resto de los cultivos, manteniendo así el cultivo lo más sano y puro posible.

Figura 3.6 Cultivo de *A. platensis* en bio-reactores tubulares en el invernadero de la ETSIAAB. Se puede observar la diferencia de densidad entre el cultivo de la izquierda (recién cosechado) y el de la derecha (esperando a ser cosechado).

Se eligió esta forma tubular por razones técnicas. Esta forma es más eficiente energéticamente, ya que permite que el bombeo de aire necesario para el cultivo y la homogenización, y la agitación, y el enriquecimiento en CO₂ necesario para el crecimiento de *Arthrospira*. El burbujeo debe partir desde el fondo de la bolsa, de manera que el propio burbujeo también nos sirva como método de agitación del sistema. Para ello se colocó una pieza de plomo en el extremo del tubo de aireación para que este se mantuviese fijo en el fondo de la bolsa. Para airear y agitar el cultivo se usó una bomba de aire SPAS de 0,4 kW.

Para purgar el cultivo, se paró la bomba durante unos minutos para dejar reposar el cultivo y que todas las células muertas y residuos se depositen en el fondo del FBR. Seguidamente, se procedía a abrir la espita inferior dejando salir una parte del cultivo que arrastra consigo las sales y células muertas acumuladas en el fondo del FBR, manteniendo así limpio y sano el cultivo. Tras la purga del medio se monitorizaba el crecimiento de la *Arthrospira* para confirmar que el crecimiento es normal. Por otro lado, se tuvo cuidado de no sellar el fondo de los tanques en ángulo recto. De haberlo hecho el fondo del FBR no se podría limpiar bien, creando una capa de células muertas y residuos en las esquinas, reduciendo así la eficiencia del purgado.

Las dimensiones elegidas favorecen distintos objetivos (Figura 3.7). Con un diámetro de 12 cm se consigue que la luz atraviese todo el cultivo y favorece que el burbujeo realice una buena acción de agitación-homogenización. La longitud de 1,2 m facilita el manejo de los FBR y que la bomba trabaje a menor presión, reduciendo los costes energéticos. A longitudes superiores el peso y el volumen de los tanques se incrementa de forma exponencial, lo que conlleva el uso de plásticos más resistentes, aumentando su grosor (más opacos) y el coste del material. Otra dificultad es la necesidad de utilizar una bomba más potente, que trabaje a una mayor presión. Estas dimensiones permiten la producción de unos 12 L de cultivo por FBR, llenos hasta 1,1 m de longitud.

$$Volumen (110\text{ cm}) = 6\text{ cm}^2\pi * 104\text{ cm} + \frac{6\text{ cm}^2\pi * 6\text{ cm}}{3} = 11.988,32\text{ cc} \approx 12\text{L}$$

Figura 3.7 Dimensiones de los FBR de plástico utilizados para el cultivo de *A. platensis*

Para trabajar con bolsas en paralelo, hubo que resolver el problema de las diferencias de presión entre bolsas, que se producen durante las fases de cosechado y alimentado. Para resolver el problema se utilizaron espitas individuales para controlar la presión de aire en cada uno de los FBR.

El manejo eficiente de un cultivo conlleva un conocimiento de sus curvas de crecimiento. Estas curvas dependen de muchos factores, entre los que se encuentra la temperatura, la exposición a la luz (tiempo e intensidad), inoculo inicial, insumos (CO₂, medio de cultivo) y otros factores. Con el fin de conocer las curvas de crecimiento, y poder manejar correctamente el cultivo en el invernadero, se desarrolló con Arduino un sensor de turbidez (Figura 3.8) que fue calibrado para el cultivo de *Arthrospira*.

Figura 3.8 Sensor de turbidez desarrollado con Arduino Leonardo, el sensor de color OPT 101 (Burr-Brown) y piezas de Lego®.

Para el calibrado se usó diferentes concentraciones de *Arthrospira* (Figura 3.9) conocidas, y tres longitudes de onda 700-635 nm (rojo), 650-490 nm (verde) y 490-450 nm (azul). Una vez calibrado, se tomaron medidas diariamente, durante un mes, obteniendo las curvas de crecimiento de los FBR usados bajo nuestras condiciones de cultivo, en invernadero.

Figura 3.9 Foto realizada durante la fase de calibrado del sensor de turbidez.

Con este objetivo se estudió el crecimiento del cultivo en condiciones controladas midiendo diariamente la concentración celular en cuatro bolsas. Estas bolsas se inocularon a una concentración inicial de 0,05 mg/L de *Arthrospira* y se cultivaron con un fotoperiodo de 14 L/10 N, normal durante el mes de mayo en Madrid, y una temperatura de 28°C. Durante los 18 días comprendidos entre el 12 y el 30 de mayo del 2015 se obtuvo una curva de cultivo como la que se muestra en la Figura 3.10.

Figura 3.10 Curva de crecimiento de la *Arthrospira* expresado en g/L en peso seco. Los puntos representan las medidas de concentración obtenidas, y la línea verde es la curva obtenida, mediante ajuste logístico del tipo $[a / (1 + \exp(b - c \cdot t(d)))]$.

Teniendo en cuenta la curva promedio obtenida, se decidió, trabajar en la zona lineal de crecimiento constante, cosechando el cultivo en el momento que alcanzaba los 0,6 g/L de *Arthrospira* peso seco (PS). Para mantenerse en ese intervalo, se cosecharon 2/3 del cultivo, dejando el cultivo a 0,23 g/L, aún en la fase lineal de crecimiento con una recuperación teórica de 7 d, aproximadamente. Tras lo cual, se diseñó un calendario de trabajo del cultivo de *Arthrospira* semanal, que se ajustara a las curvas de crecimiento (Tabla 3.5).

Tabla 3.3: Calendario de trabajo en el cultivo de *A. platensis* en el invernadero.

	<i>Lunes</i>	<i>Martes</i>	<i>Miércoles</i>	<i>Jueves</i>	<i>Viernes</i>
<i>Semana</i>	Purgar hacer medio	Cosechar Secar	Purgar 1/2 Alimentar	2/2 Alimentar	Purgar Control madres

Los 40 BR de 12 L; 36 en producción y 4 como cultivos madres, permitió un ritmo de cultivo constante superior a los 150 g semanales, obteniéndose una media de 691,2 g en PS de *Arthrospira* al mes. Para la renovación del medio de cultivo se dispuso de una cuba de 150 L que se utilizó para desclorar el agua del canal y preparar el medio de cultivo enriquecido.

$$36 \text{ tanques} \cdot \frac{12L}{\text{tanque}} \cdot \frac{2}{3} \cdot \frac{0,6g (PS)}{L} \cdot \frac{4}{\text{mes}} = 691,2 \frac{g (PS)}{\text{mes}} \text{ Arthrospira sp.}$$

La cosecha se efectuó a primera hora de la mañana, como recomienda Jourdan (1999). Durante la noche, *Arthrospira* consume parte del azúcar y grasas, y como consecuencia la concentración de proteínas es más elevada por la mañana. Para realizar la cosecha, se dispuso de una tela filtro de entre 46 µm de poro, y un cubo limpio para rescatar el medio.

Tras purgar el fondo del FBR, se dejó escapar los primeros ml de cultivo, evitando tomar cultivo muerto o en fermentación que pueda estropear el secado. Se filtraban 2/3 del cultivo, dejando el FBR a 1/3 de capacidad. Tras la cosecha se renovaba el medio, añadiendo 1/3 del medio cosechado rescatado y 1/3 de alimento o medio nuevo enriquecido (Figura 3.11). Es importante que el medio de cultivo nuevo se encuentre a la misma temperatura que el medio de cultivo antiguo, para no crear choque térmico que pueda ocasionar problemas, como la caída del cultivo.

Figura 3.11 Izquierda, Foto realizada durante un día de cosecha de *A. platensis* con maya de 46 µm. Derecha, esquema del FBR, así como las indicaciones cosecha y alimentación.

Antes del secado, se limpiaba el cultivo cosechado con agua limpia procedente del canal, durante un tiempo estimado de unos 5-6 min, con la intención de extraer el exceso de sales. El secado de la *Arthrospira* se realizó en dos fases. En la primera fase o fase de concentración se elimina el 90% de la humedad y exceso de agua retenido en el cultivo. El cultivo fue escurriendo en el paño de forma mecánica, compactando a una presión de aproximadamente de 0,2 kg/cm². Tras lo cual, entraba en la segunda fase o de secado por aire. En este segundo paso, se vertía 0,5 cm del alga concentrada en bandejas de plástico de calidad alimentaria de 1,5 cm de profundidad, para posteriormente secarse en oscuridad, en un sistema de secado por corriente de aire horizontal. Para ello se usó una corriente de aire caliente, producida por una turbina de aire industrial (32 kW) a una temperatura controlada de entre 35-40°C. El secado debe hacerse en oscuridad y con temperaturas no muy elevadas para evitar la degradación de proteínas, vitaminas y otros compuestos, que son de vital importancia para el desarrollo de la investigación (Jourdan, 1999). Finalmente, para conservar la *Arthrospira*, se empaquetó en bolsas de auto cierre, etiquetadas con día y fecha del cultivo. Las bolsas se conservaron en oscuridad en una caja de aluminio a 4°C, para su posterior utilización.

3.3 ANIMALES Y ALOJAMIENTO

Para criar en cautividad cualquier animal, concretamente *O. niloticus*, se ha de conocer y tener en cuenta sus necesidades biológicas, tanto de ambientales como comportamentales.

3.3.1 Calidad del agua

Los peces del género *Oreochromis* sp. son muy robustos y toleran altas densidades de cría y bajas calidades de agua, entre otros factores estresantes. Según distintos autores, existen varios indicadores que reflejan la calidad del agua y que se pueden medir desde el punto de vista del comportamiento, de la morfología o de la producción (Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Indicadores fisiológicos basales de la calidad de agua según Branson (2000).

Categoría	Indicador	Problema de calidad de agua
Comportamiento	Agregación cerca de la superficie	↓OD.
	Incremento en tasa de respiración	↑H ₄ N ⁺ ; ↓OD; ↑CO ₂ .
	Disminución consumo	↑H ₄ N ⁺ .
	Híper-excitabilidad	↑H ₄ N ⁺ .
	Nado errático	↑H ₄ N ⁺ .
	Perdida de equilibrio	↑H ₄ N ⁺ .
	Letargo, desorientación, moribundo	↑H ₄ N ⁺ ; ↑CO ₂ .
Morfología	Lamelas de las branquias rojo-brillante,	↑CO ₂ .
	Daño en las branquias	↑H ₄ N ⁺ ; ↓OD; ↑NO ₂ ; ↑Sólidos en Suspensión.
	Sangre marrón	↑NO ₂ ⁻ .
	Daños en timo	↑NO ₂ ⁻ .
	Desarrollo anormalidades	↑NO ₃ ⁻ ; T ^a .
	Nefro-calcinosis	↑CO ₂ .
	Enfermedades de burbujas	↑↑O ₂ .
Producción	Disminución de crecimiento	↑H ₄ N ⁺ ; ↓OD.
	Incremento del consumo	↑H ₄ N ⁺ ; ↓OD.
	Mortalidad	Nivel letal de algún parámetro.

OD: Oxígeno Disuelto

La calidad del agua es un factor importante para el bienestar de los peces. La información sobre las condiciones del agua se obtiene a través de métodos que van desde medición *in situ* con equipos para monitorear el agua hasta sofisticados sistemas de control por ordenador.

Durante la primera prueba (*two-choices*), las mediciones de la calidad del agua se tomaron dos veces por semana en todos los tanques. Los días elegidos fueron los lunes y jueves después de la primera comida (9:30 a 10:00 h). Las mediciones incluyeron oxígeno disuelto (DO₂), conductividad eléctrica (EC) y niveles de amoníaco, nitritos y nitratos (Hanna HI83203). Los parámetros de calidad del agua se mantuvieron dentro de los valores normales para el crecimiento de *O. niloticus* (media $\pm$ SE; temperatura $27,3 \pm 0,25$ °C; pH $7,36 \pm 0,33$; EC $0,60 \pm 0,07$ dS; O₂ $7,19 \pm 0,17$ ppm; H₄N⁺ $0,01 \pm 0,02$ ppm; NO₂⁻ $0,01 \pm 0,02$ ppm; NO₃⁻ $13,48 \pm 5,78$ ppm), y no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos.

En la prueba 2 y 3 (pre-engorde y metagenómica), se tomaron también medidas dos veces a la semana, cada lunes y jueves. Las mediciones se tomaron en las salidas de *race-ways* después de la primera comida (9:30 a 10:00 h). La temperatura de los *race-ways* fue controlada cada 5 min por sensores de temperatura Hobo con sonda sub-acuática. Los parámetros de calidad del agua estuvieron dentro de los rangos normales para la tilapia (temperatura $27,3 \pm 0,3$ °C, pH $8,38 \pm 0,15$, EC $0,50 \pm 0,01$ dSm, O₂ $7,12 \pm 0,05$ ppm, H₄N⁺ $0,43 \pm 0,29$ ppm) y no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos, ya que compartían la misma agua. La temperatura media durante la fase de adaptación fue de 23,0 °C (SD $\pm 1,82$) con un máximo de 26,7 °C y un mínimo de 17,8 °C. El promedio de temperatura de ensayo fue de 24,4 °C (SD $\pm 1,0$) con un máximo de 26 °C y un mínimo de 21,3 °C.

3.3.2 Base biológica de *O. niloticus*

Los peces utilizados tuvieron dos lugares de procedencia. Los alevines de *O. niloticus* de la primera prueba (*two-choices*) fueron originalmente adquiridos de Valenciana de Acuicultura (Puçol, Valencia) descendencia de tilapias denominadas *genetically male tilapia* o GMET®, provenientes de una población de supermachos (YY)

y hembras (XX) de la empresa Fishgen SL (Sawasee, Reino Unido), lo cual origina una prole homogénea masculinizada de alevines machos (XY).

Para la prueba de pre-engorde y de metagenómica, se adquirieron 12 reproductores directamente de la empresa fishgen SL (Sawasee, Reino Unido) reproductores YY y XX. De los cuales se seleccionan machos (2) y las hembras más grandes (6), para la criar alevines machos (XY) para la experimentación. Se alojaron en uno de los invernaderos anteriormente mencionados, y durante los meses de verano en las instalaciones de Acuicultura de la ETSIM. La diferenciación temprana entre sexos se debe realizar cuando los peces sobrepasan los 100 g, y se basa en que el macho presenta dos orificios en el vientre el ano y orificio urogenital, mientras que las hembras poseen tres, ano, poro genital y el orificio urinario (Figura 3.12).

Figura 3. 12 Diferenciación sexual en *O. niloticus*.

3.3.2.1 SUPERMACHOS GMET®

Los “supermachos” son machos que presentan un genotipo YY, con dos cromosomas que determinan el sexo masculino en lugar de uno, como el genotipo masculino que se produce de forma natural (XY).

La técnica para la obtención de “supermachos” sigue los siguientes pasos (Figura 3.13): Seleccionar los mejores peces con las características óptimas de peso y talla deseadas y se hacen criar. A una parte de la generación obtenida (machos y hembras), se les suministra hormonas femeninas, lo que consigue convertir a cierto porcentaje de machos en hembras funcionales. Tendremos de esta manera un tanto por ciento de hembras XX y otro tanto por ciento de hembras XY, aunque genéticamente son XY, fenotípicamente son hembras con capacidad reproductora. Estas hembras (XY) se cruzan ahora con machos normales, también XY. Entre su descendencia habrá hembras (XX), machos normales (XY) y los supermachos (YY). Para identificar los supermachos, entre el conjunto de machos, se cruzan con hembras normales (XX) y se observa la descendencia.

Figura 3. 13 Esquema de la técnica para la obtención de Supermachos

3.3.3 Tanques utilizados.

3.3.3.1 Tanques de recirculación de Agua (RAS)

La prueba 1 (*two-choices*) con alevines se realizó en el invernadero usando 16 tanques de fibra de vidrio verde con un volumen de 120 L (Figura 3.14), de 0,46 m de altura y 0,64 m de diámetro en la parte superior, terminado en cono en la inferior, lo que facilita su limpieza. Todos los tanques cuentan con una tapadera transparente para evitar que los peces salten fuera del tanque o a otro tanque adyacente.

Figura 3.14 Tanques troncocónicos utilizados, dimensiones, y flujo de agua con el desagüe en la parte inferior y salida al filtro a 1/4 de la base.

Uno de los factores más importantes en un sistema RAS es el reciclaje de los residuos producidos por los peces. Este se lleva a cabo gracias a un desagüe colocado en el fondo del tanque, por el que se elimina la mayor parte de los residuos sólidos mediante purgado, y mediante una salida al filtro colocado a $\frac{1}{4}$ de altura del fondo. Los filtros realizan los ciclos de degradación del nitrógeno, el fósforo y otros elementos. Los compuestos nitrogenados son contaminantes habituales en los sistemas de acuicultura, ya que los peces producen y excretan varios productos nitrogenados de desecho, en su mayor parte como amoníaco, y deben ser mantenidos dentro de concentraciones aceptables. Los nitritos son especialmente tóxicos para los peces, oxidan la hemoglobina transformándola en metahemoglobina, que tiene muy poca capacidad de transportar oxígeno (Lewis y Morris, 1986).

Durante los experimentos, un filtro (EHEIM classic; Mod 2217, Figura 3.15) de 6 L capacidad, 20 W y un flujo de agua de 1000 L h⁻¹ se conectó a cada tanque. La toma de agua al filtro se toma a 1/4 de la altura de la base del tanque, para evitar la entrada de partículas gruesas, y restos de alimentos, que podría disminuir la eficiencia de los filtros. Estas partículas gruesas se extraen mediante purgado de los tanques 2 veces a la semana. El agua no se cambió en ningún momento durante los experimentos. Únicamente se repuso el agua perdida por evaporación, y por las purgas. Para este rellenado, siempre se usó agua del Canal previamente desclorada. Aunque los Filtros EHEIM de acuario no son los más comunes en la producción de alto rendimiento para la acuicultura, se usaron para poder aumentar el número de réplicas y para controlar la calidad de agua en cada tanque individualmente. Los filtros se rellenaron como se indica en la Figura 3.12, con 1150 g de canutillos EHFIMECH, dos almohadillas de esponja, 1200 g de piedras porosas EHFIMECH, una esponja blanca de algodón y una de fina negra de carbón activo.

Figura 3.15 Filtros EHEIM classic; Mod 2217 con su conformación para el experimento.

Los filtros se prepararon inoculando bacterias nitrificantes (EHEIM water care), utilizando las indicaciones del proveedor. Se estimó la cantidad de nitrógeno amoniacal total (NAT) que iban a producir los peces basándose en la tasa de alimentación según Timmons *et al.* (2009). Se añadió el amoniaco estimado diariamente, probando la actividad microbiana, y la evolución de los compuestos nitrogenados, hasta que fue satisfactoria, lo que ocurrió transcurridas aproximadamente 3 semanas.

$$NAT = \frac{F \cdot PC \cdot 0.092}{t} \xrightarrow{\text{Alevines}} \frac{3g \cdot 38\% \cdot 0.092}{1 \text{ día}} = 0.105 g$$

$$NAT_{ppm \text{ portanque}}(120 L) y día = \frac{105 \frac{mg NAT}{día}}{120 L} = 0.875 ppm$$

F, (feed) Alimentación en peso.

PC, % proteína cruda en pienso.

t, tiempo.

0.092, constante en la ecuación de nitrógeno amoniacal total (NAT) que se basa en una aproximación de estimaciones.

$$0.092 = 0.16 \cdot 0.80 \cdot 0.080 \cdot 0.90$$

16%, nitrógeno en la proteína.

80% nitrógeno asimilado por el pez.

80% nitrógeno asimilado que es excretado.

90% del nitrógeno es excretado como NAT.

El sistema de aireación para los tanques se resuelve con una bomba Million Air-MA 200 de 4 W de potencia, que proporciona el aire necesario a los tanques por medio de un tubo de silicona insertado dentro de cada uno de los tanques. Se utilizaron calentadores de agua de 150 W (ATAMAN N2867; 50-60 Hz; 20-34 °C), graduados a 28 °C para mantener la temperatura constante durante el experimento. El fotoperiodo fue natural.

Para la Prueba 2 se llevaron los peces a la piscifactoría de ETSIAM (Figura 3.16). Esta se encuentra construida en una pequeña pendiente dividida en terrazas. El sistema consta de un canal interior que distribuye agua entre los *race-ways* laterales donde se situaran los peces. Estos tanques laterales tienen una capacidad estimada de 5,16 m³, que, a su vez, están divididos en 5 partes, mediante rejas metálicas, creando espacios de 1 m³. Los canales tienen un flujo de agua dulce constante que proviene de un pozo subterráneo (0,2 L/s). Los tanques se encuentran al aire libre, por lo que los peces están sometidos a una temperatura y fotoperiodo natural.

Figura 3.16 Race-ways utilizados en la prueba de pre-engorde y metagenómica. Dimensiones, y flujo de agua.

3.4 ALIMENTO

Durante la fase de aclimatación todos los peces fueron alimentados con pienso comercial (T3 Skretting), que también fue la base de los piensos para las pruebas que se suplementaron con *A. platensis*. Para la preparación de los piensos se ha de tener en cuenta que el tamaño de partícula de la alimentación debe ser ajustado a la boca del pez. Para la prueba con los alevines de *Oreochromis* sp. (1 a 5 cm) el tamaño de los gránulos estaba comprendido entre 0,1-0,2 cm. Por lo tanto, la alimentación de base (T3 Skretting) se trituró y se peletizó a 0,1 a 0,2 cm. Para las alimentaciones del tratamiento con algas, el pienso tamizado se mezcló con 10 g de *A. platensis* por kg de alimento, y se peletizó al mismo tamaño (0,2-0,1 cm). Para los animales de pre-engorde se realizó el mismo tratamiento solo que se peletizó a un tamaño mayor de 0,5-0,7 cm. El pienso se mantuvo a 4°C hasta su utilización.

Figura 3. 17 Piensos utilizados en las distintas pruebas. A) piensos en granulo de 0,1 - 0,2 Ø cm para la prueba de alevines, B) pienso peletizado a 0,5 - 0,7 Ø cm para la prueba de pre-engorde y metagenómica.

Los alevines se alimentaron a un 6% de peso vivo usando un autoalimentado (EHEIM 3581). En el caso de pre-engorde y metagenómica, en los *race-ways* se utilizaron los comederos de cinta, que distribuye el pienso a lo largo del día a una tasa de 3% del peso vivo.

Las dietas experimentales, el control (CTR) y la dieta conteniendo *A. platensis* (SPR), fueron analizadas por el laboratorio de nutrición de la ETSIAAB. Para analizar la composición proximal de la alimentación se tomaron cinco muestras por tratamiento y el porcentaje de materia seca se obtuvo por secado en horno a 105 °C, hasta peso constante,

y el contenido de cenizas por incineración 550 °C. El contenido de proteína se midió mediante análisis de Kjeldahl y el extracto de éter por hidrólisis. El contenido de fibra se obtuvo mediante el método de Van Soest (1991) y finalmente la energía se calculó usando un calorímetro de bomba. Ambas alimentaciones fueron isocalóricas (energía bruta) e isoproteicas (proteína bruta), 5,02/4,98 kcal/g MS y 44,6/44,8 CP% MS (Tabla 4.2).

Tabla 4.1 Composición aproximada de dietas experimentales (materia seca, cenizas, proteína bruta PB, extracto de éter de éter EE, fibra detergente neutro FDN, fibra detergente ácida ADF, lignina de detergente ácido ADL y energía bruta).

	Control	<i>A. platensis</i>	Unidades
Materia Seca	92,60	9260	%
Cenizas	7,39	7,37	%
PB	44,59	44, 3	%/MS
EE.	6,39	6,44	%/MS
NDF	26,4	26,23	%/MS
DF	4,9	5,05	%/MS
DL	0, 6	0, 7	%/MS
Energía Bruta	5,00	4,9	kcal/g MS

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.5.1 *Consideraciones de bienestar animal al sacrificio*

Todos los animales se trataron de acuerdo a las consideraciones de bienestar animal siguiendo la normativa del departamento y aprobado en el comité de ética de la ETISAAB, según el Real Decreto 53/2013 de bienestar animal (BOE, 2013). En todas las pruebas y ensayos en los que hubo que sacrificar un animal, estos fueron anestesiados previamente usando eugenol a una concentración de 100 mg/L (Delbon y Paiva, 2012) durante 2 min y sacrificados cortando la espina dorsal detrás del opérculo (Lopez-Luna *et al.*, 2016).

3.5.2 *Prueba 1 Two-Choices*

Esta prueba tiene como objetivo verificar si el suplemento alimenticio al 1% de *A. platensis* modifica la respuesta conductual al estrés, mediante una prueba no invasiva, así como las variables de producción básica en la producción de alevines como crecimiento, supervivencia y calidad del agua. Para ello se utilizaron los tanques troncocónicos especificados en la sección anterior. Tras preparar los filtros se introdujeron 25 alevines al azar por tanque, y se dejaron durante un período de aclimatación de dos semanas, bajo un mismo nivel de alimentación. Después de este período todos los peces de cada tanque fueron pesados en grupo y su longitud medida individualmente. El peso medio inicial por tanque fue de 2,64 g ($n = 25$) con una desviación $SD \pm 0,45$ g. La longitud inicial de los peces fue de 1,17 cm con una desviación del $SD \pm 0,10$ cm, sin diferencias por tratamientos.

Los alevines se alimentaron a razón de 6% de peso vivo usando un dispensador automático (EHEIM 3581) que proporcionó cuatro comidas al día (7:00 h, 12:00 h, 17:00 h y 22:00 h), comenzando la prueba desde el 04-08-2015 hasta el 24-09-2015, por un total de 50 días (7 semanas). Los filtros se apagaron durante 20 min después de cada comida para evitar la pérdida de alimento. Durante este periodo de siete semanas se revisaba diariamente las bajas y se tomaran datos de crecimiento de los peces y su supervivencia. Tras finalizar este periodo se llevó a cabo el test *two-choices*. Se realizaron 12 pruebas de *two-choices*, utilizando seis tanques por tratamiento, descartando los tanques con menos de 20 alevines. En el caso de los alevines que recibieron *A. platensis*, todos los tanques tenían más de 20

peces, por lo que los tanques usados para la prueba de *two-choices* fueron elegidos aleatoriamente lanzando un dado de 8 caras.

La prueba de *two-choices* comenzó con la introducción de 20 peces tomados al azar desde un mismo tanque. Se dejaron en el Tanque A para aclimatarse durante un periodo de 30 min. Transcurrido el periodo de adaptación, se abrió la compuerta que daba paso al segundo tanque (Tanque B), y se comenzó a burbujear el Tanque A con nitrógeno, para disminuir los niveles de oxígeno (a una velocidad de 1 ppm por 10 min) y el Tanque B se mantuvo con niveles normales de oxígeno (aproximadamente 7 ppm). El nivel de oxígeno disuelto en los tanques se monitorizó cada 10 min. Cada prueba se registró con una cámara de vídeo (Nikon 3500) para no afectar a los peces por presencia humana. Se observaron y anotaron los tiempos en que cualquier pez abandona el Tanque A para entrar en el B. La prueba se dio por terminada cuando los primeros cinco peces habían dejado el Tanque A o transcurrida una hora de prueba (si menos de cinco alevines dejaron el Tanque A). Después de este periodo se midieron, mediante técnica fotográfica, los peces que cruzaron al Tanque B, como anteriormente se midieron todos los peces mediante la misma técnica, se puede extrapolar el tamaño de los peces que permanecieron en el tanque A.

3.5.3 Prueba 2 Pre-Engorde

Para esta prueba, 250 alevines de *O. niloticus* fueron criados usando los reproductores originarios de Sawansee (Reino Unido) y sometidos a un proceso de masculinización y criados con pienso comercial (T3 Skretting) en el mismo sistema RAS (ubicado en Madrid, 40 ° 27'03.0 "N 3 ° 43'16.9" W) hasta alcanzar los $90,2 \pm 2,6$ g ($M \pm SE$). Posteriormente, se seleccionaron 100 peces de tamaño más homogéneo para la prueba. Cada pez fue identificado individualmente con un microchip (i-Tag 162,2x12 mm) colocado bajo la aleta dorsal, medido, fotografiado (Imagen 3.18) y asignado a uno de los dos tratamientos. Los peces se trasladaron a las instalaciones de la ETSIM, donde se distribuyeron en uno de los tanques de 1 m³ de un *race-way*.

Figura 3.18 Fotografía de la entrada del pez E9B6. Cada pez fue identificado individualmente con un microchip (i-Tag 162,2x12 mm) colocado bajo la aleta dorsal, medido, fotografiado y asignado a uno de los tratamientos.

Se usaron dos secciones por tratamiento, 25 peces por tanque, para simular concentraciones comerciales de 3 kg/m³. Los peces tuvieron un período de aclimatación de aproximadamente 3 semanas (-22 d a -1), durante el cual se alimentaron con alimento control (CTR), al inicio del 3% de peso vivo, antes de que el ensayo comenzara con los diferentes alimentos. Para distribuir el alimento se utilizaron comederos de cinta, que distribuyen la comida de forma homogénea a lo largo del día. La alimentación experimental se suministró durante 7 semanas al 3,5% de peso vivo durante el ensayo. Transcurridas las 7 semanas, se tomaron muestras de sangre de los peces y se analizaron los parámetros de crecimiento y de calidad de la carne.

3.5.4 Prueba 3 Metagenómica

En la prueba 3 se analizó el microbiota existente en el intestino de los peces y el efecto de la suplementación con *A. platensis*. Para ello se tomaron 16 peces de la prueba 2 (pre-engorde), 8 por tratamiento. Estos individuos fueron criados bajo condiciones ambientales idénticas y controladas, tanto en su cría como durante la prueba de pre-engorde. Esta consideración es importante pues varios estudios realizados en *O. niloticus* muestran que el microbiota ambiental puede afectar a la composición del microbiota intestinal (Giatsis *et al.*, 2015; Giatsis *et al.*, 2014).

3.6 Técnicas y métodos experimentales

3.6.1 Crecimiento de los peces y supervivencia de los alevines

Los peces fueron contados, pesados en grupo a 0 y 30 días, y contados, pesados individualmente, y medidos a 50 días (Figura 3.19). Para poder realizar el contado y la medición de los peces a esta temprana edad sin causar daños se utilizó una técnica fotográfica. Los peces se recogían y se depositaban en una bandeja con un centímetro de agua. Se realizó una fotografía con una cámara digital (Nikon 3500), incluyendo una regla dentro de la bandeja para tener una referencia de la medida. Estas fotos se revisaron, contando los individuos e interpolando las medidas, por duplicado, obteniendo las medidas totales de cada uno de los peces.

Es conocido que durante la fase de alevinaje las bajas suelen ser frecuentes. En este estudio, queríamos comprobar si la suplementación con *A. platensis* pudo mejorar la supervivencia de los alevines. Para estudiar esto, los tanques se revisaban diariamente; las bajas se registraban y se eliminaban. Posteriormente tanto en el día 30 del experimento como en el día 50, durante la realización de los controles de peso y longitud, se pudo comprobar el número de peces que permanecieron vivos y se verificó que algunas de las bajas fueron devoradas por sus congéneres y no fueron contabilizadas durante en el control diario.

Figura 3.19 Fotografía utilizada para poder medir y contar los alevines a la entrada a los tanques.

3.6.2 *Two-choices test*

3.6.2.1 Prueba de comportamiento no invasiva "*Two-Choices*"

La ética y el bienestar de los animales tiene cada vez más importancia tanto en la investigación como a los sistemas de producción animal. En la última década se han realizado muchos estudios sobre el bienestar de los peces (Huntingford, 2006), y se han propuesto varios métodos para medir el estrés, métodos que generalmente son invasivos, aunque también existen métodos no-invasivos como la prueba de elección "*two choices*" o de selección entre dos opciones.

Este método es usado para diferenciar entre dos estilos o personalidades en animales para afrontar el estrés (Laursen *et al.*, 2011). La prueba consiste en dar a elegir a los peces entre dos ambientes, a los que se denominarán A y B. Normalmente esto implica situaciones de estrés diferenciadas, entre A y B. La elección por una situación de estrés A o B, dependerá de una serie de factores.

Uno de estos factores es el estilo de afrontamiento al estrés. En este sentido Barreto *et al.* (2011) han propuesto que *O. niloticus* puede clasificarse en dos estilos opuestos, a saber: proactivo (dominante) o reactivo (pasivo). El desarrollo de un estilo depende de la composición genética del pez y de su experiencia previa (Sørensen *et al.*, 2013). Pero se sabe menos acerca del posible efecto que el estado nutricional puede desempeñar a este respecto, y qué papel puede desempeñar la suplementación con *A. platensis*.

La prueba se basa en el hecho de que los peces prefieren la penumbra a la luz, donde se sienten más seguros. Por otro lado, los niveles de oxígeno bajos hacen que se sientan incómodos e intenten buscar alternativas a esa situación. Bajo estos preceptos, se parte de una situación inicial con dos tanques unidos por un canal. El Tanque A permanece en penumbra, mientras que el Tanque B permanece iluminado. De esta forma, todos los peces permanecen en el Tanque A (oscuro) y poco a poco se va disminuyendo los niveles de O₂. De esta forma obligamos a los peces a tomar la decisión de quedarse o buscar una alternativa (Tanque B, iluminado), bajo la suposición de que los peces más débiles e inseguros serán los primeros en abandonar el tanque A y pasar al B.

Durante los ensayos para poner a puesta la técnica de "*two-choices*" (figura 3.20), se observó algunas consideraciones a tener en cuenta. La primera es que si la fuente de luz

utilizada en el tanque B es muy directa e intensa los peces no salen del tanque pese a las bajadas de O_2 . Asimismo, la luz utilizada debe ser indirecta a un ángulo de entre 40° - 60° , con 2 bombillas de 100 W, que son las que usamos durante la experimentación.

Figura 3.20 Fotografía de los tanques durante los ensayos del experimento “*Two-Choices*”, en los invernaderos de los campos de prácticas de Agrónomos, UPM.

La segunda es que por debajo de 2 ppm de O_2 , existe un punto de no retorno. A estos niveles de oxígeno los peces permanecen inmóviles y en estado de letargo. Tercero, la hora del día en que se realiza la prueba es clave, pues los peces son más activos a primeras horas de la mañana y ultimas de la tarde, y son menos activos al medio día y en la tarde, por lo que las pruebas se han de realizar dentro de una misma franja horaria y de la forma más simultánea posible. Y la cuarta consideración, el canal de unión de los dos tanques debe ser lo más estrecho posible pues es el lugar idóneo para afrontar esta prueba, y si un pez dominante ocupa esta posición no dejará cruzar el canal a ningún otro individuo, invalidando la prueba completamente.

3.6.2.2 Tanques Two-Choices

La prueba se llevó a cabo utilizando dos tanques circulares negros idénticos (120 L) de 0,64 m de altura y 0,54 m de diámetro que se unieron entre sí mediante una compuerta (Figura 3.21), con 16 cm de diámetro. El Tanque A estaba cubierto con plástico negro (sombreado) y el tanque B estaba iluminado. Se instaló un flujo de agua en contracorriente en cada tanque para evitar el flujo de agua entre los tanques A y B.

Figura 3.21 Esquema y medidas de los tanques utilizados para la realización de la prueba de “Two-Choices”.

3.6.3 Prueba 2. Parámetros biométricos

En la prueba de pre-engorde se pesaron y se midieron de forma individual cada pez al introducirlos en su jaula (-22 días), al comienzo de la prueba (0 días) y al final de la prueba (50 días), así como la alimentación utilizada en cada tanque (Figura 3.22). Como parámetros de crecimiento se tomaron la ganancia media diaria en % (GMD), y el índice de conversión de alimentación del tanque (IC).

3.6.3.1 Ganancia media diaria

La ganancia media diaria mide habitualmente se expresa en gramos y se calcular de la manera siguiente:

$$\text{GMD} \left(\frac{\text{g}}{\text{d}} \right) = \frac{\text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}}{(\text{días transcurridos})}$$

3.6.3.2 Índice de conversión alimenticia

El índice de conversión (IC) es un parámetro que evalúa la "calidad" del crecimiento. El IC depende de muchos factores. La manera de calcularlo es la siguiente (el parámetro no tiene unidades):

$$\text{ICA} = \frac{\text{Alimento suministrado (g)}}{\text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}}$$

Figura 3.22 Trabajos de aturdimiento, pesado y medición en la prueba de pre-engorde.

3.6.4 *Parámetros de calidad de la carne*

3.6.4.1 **Rigor mortis**

Para evaluar la evolución del *rigor mortis*, este se midió a las 0 h, 6 h, 24 h, y 48 h *post mortem* utilizando el método Cuttinger (Korhonen *et al.*, 1990). Este método consiste en colocar al pez sobre una superficie plana y dejar colgar la parte posterior desde el borde y sin ningún apoyo desde el extremo posterior de la aleta dorsal. Se mide el “ángulo de *rigor mortis*” calculado como $\alpha = \tan^{-1}(x/y)$, donde “x” es la longitud (cm) del cateto horizontal del triángulo rectángulo formado e “y” es la longitud (cm) del cateto vertical (Figura 3.23).

Figura 3. 23 Evolución y medición del *rigor mortis*. Método Cutting (Korhonen *et al.*, 1990).

3.6.4.2 pH muscular

Se determinó la evolución del pH muscular con 20 peces por tratamiento usando el pH-metro de Hanna Instruments HI-9025 (Hanna Instruments, SL), introduciendo la sonda en el musculo dorsal derecho (Figura3.24). Las medidas se tomaron a las 0h, 6h, y 24h horas *post-mortem*, registrando a su vez la temperatura de la toma de muestras.

Figura 3.24 Fotografía de la medición de pH y la T^a durante uno de los ensayos.

3.6.4.3 Color

Para su determinación se midió el color de la carne en el lomo superior a 0 h y 24 h *post mortem*, utilizando el espectrofotómetro Minolta CM-2500c (Minolta, Osaka, Japón). Para su determinación, el CIE $L^* a^* b^*$ fue utilizado (Internacional Comisión de l'Eclairage, CIE, 2004). Este sistema permite identificar un color con las coordenadas L^* (luminosidad), a^* (índice rojo) y b^* (índice de amarillo) y calcular C^* (chroma) y h^* (hue). También se obtuvo el espectro visible del color de la carne de 360 a 740 nm. Las medidas se tomaron por triplicado sobre 20 peces por tratamiento (Figura 3.25).

Figura 3.25 Modelo CIELAB.

3.6.5 Parámetros hematológicos

Se extrajeron muestras de sangre de la vena caudal de 20 ejemplares por tratamiento, usando jeringas de 2 ml (BD, Franklin Lakes, New Jersey, EE.UU.). Se centrifugó 1 ml de la muestra a 6000 rpm durante 10 min y se extrajo el plasma para medir el cortisol, lactato y la glucosa (usando fluoruro como anticoagulante). Se utilizó 1 ml de sangre adicional para cuantificar leucocitos y establecer el hematocrito (con EDTA como anticoagulante) y se almacenaron inmediatamente a 4°C hasta su análisis (López-Luna *et al.*, 2016).

3.6.5.1 Cortisol

El cortisol plasmático se determinó mediante ELISA competitivo. Primero, se pipetearon 10 µl de cada muestra en los pocillos correspondientes, recubiertos con antisuero anti-cortisol de conejo. Seguidamente se añadieron 200 µl de conjugado de enzima en todos los pocillos, excepto para el pocillo del blanco. Los pocillos se incubaron durante 60 min a 37 °C. Durante esta primera incubación, el cortisol muestra compite con el cortisol conjugado con la peroxidasa de rábano (HRPO) por los sitios específicos del antisuero de los pocillos. Después de la incubación, todo el material no unido se elimina mediante aspiración y se lava cuatro veces con 300 µl de solución de lavado diluida (solución salina tamponada con fosfato, PBS). Se realizó una segunda incubación de los pocillos con 200 µl de una solución de cromógeno (tetrametilbezidina, TMB) en un tampón citrato-fosfato durante 15 min a 37 °C. Finalmente, para finalizar la reacción se pipetearon 100 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) en los pocillos. La lectura de color se hace mediante espectrofotómetro (Hitachi 717®) en dos longitudes de onda, 450 nm y 405 nm. Se utiliza como blanco agua destilada para la referencia colorimétrica.

Para determinar la concentración de cortisol se realiza una curva de concentraciones patrón 0, 10, 30, 100, 300 y 900 ng/ml. La lectura se debe realizar dentro de los siguientes 20 min tras la finalización de la prueba. Se utilizan dos longitudes de onda para mejorar la lectura. Los valores comprendidos entre 30-900 ng/ml se leen a 450 nm, mientras que, para valores bajos, inferiores a 30 ng/ml, se obtiene una mejor resolución a 405 nm.

3.6.5.2 Glucosa

Para la medición de la concentración de glucosa en sangre se realizó formando complejos coloreados (Quinoaimina) siguiendo dos reacciones enzimáticas acopladas. La primera reacción se produce cuando la muestra se pone en contacto con oxígeno y agua con la acción de la enzima glucosa oxidasa (GOD, 250 UI/ml), que forma ácido glucónico y peróxido de hidrogeno (H₂O₂). En la segunda reacción el H₂O₂ reacciona en presencia de peroxidasa (POD, 20 UI/ml), 4-aminoantipirina (12.5 mmol/l) y fenol (5 mmol/l) para formar el compuesto de color quinonaimina.

Para realizar el ensayo se mezclan 10 µl de suero de la muestra y 10 µl de la solución patrón de glucosa (100 mg/dl) con 1 ml de la solución reactiva. Se deja incubar 30 min a temperatura ambiente y se mide la absorbancia del patrón y de la muestra frente a un blanco de solución reactiva a 505 nm en un espectrofotómetro (Hitachi 717 ®). La intensidad del color producido es proporcional a la concentración de la glucosa en la muestra y es estable durante 2 h. La concentración de glucosa (mg/dl) se calcula aplicando la formula siguiente:

$$\frac{Abs.muestra}{Abs.patrn} \times Conc.patrn$$

3.6.5.3 Lactato

La concentración de lactato se mide por la transformación enzimática a un compuesto coloreado (Quinona) en dos fases. En la primera fase, el suero en presencia de oxígeno y agua por acción de la enzima lactato oxidasa (LO, 800 UI/I) forma piruvato y H₂O₂. El H₂O₂ reacciona en presencia de la POD (2000 UI/I), 4-aminoantipirina (0,4 mmol/l) y 4-clorofenol (4 mmol/l) para formase un compuesto de color rosáceo, quinona.

Los reactivos se tamponan en una disolución de fosfato a pH 7,5. Para realizar el ensayo se mezclan 10 µl de suero de la muestra y 10 µl de una solución de lactato patrón (10 mg/dl) con 1 ml de disolución de reactivos, se dejan 10 min a temperatura ambiente y se lee la absorbancia en un espectrofotómetro (Hitachi 717 ®) a 505 nm de las dos mezclas utilizándose como blanco la disolución de los reactivos.

Para el cálculo de la concentración de lactato (mmol/l) se aplica la siguiente formula:

$$\frac{Abs.muestra}{Abs.patrn} \times Conc.patrn$$

3.6.5.4 Lactato deshidrogenasa (LDH)

Se determina la actividad enzimática mediante la reacción de hidrogenación del piruvato a L-lactato en presencia de NADH. Se valora la extinción por minuto de la reacción de la mezcla de 0,1 de la muestra (plasma en EDTA) con 2,5 ml de solución reactiva (0,6 mmol/l de piruvato y 0,18 mmol/l de NADH con tampón fosfato 50 mmol/l a pH 7,5), utilizando los tiempos 30'', 1'30'', 2'30'' y 3'30''. La extinción por minuto se valora

por la reducción de la absorbancia entre los tiempos dados, a una longitud de onda de 340 nm. La temperatura de ensayo fue de 30°C.

La actividad de la LDH (U/I) se calcula multiplicando la extinción por minuto media de las tres medidas multiplicada por 4921. Cuando la actividad enzimática es alta, el valor de la extinción por minuto a los 3 min de ser inferior a 0,1, en estos casos se mide de nuevo la reacción diluyendo 1/10 con una solución de NaCl al 0.9% y multiplicando la extinción por minuto media por 49210.

3.6.5.5 Creatina fosfoquinasa (CPK)

Se valora la actividad enzimática de desfosforilación del fosfato de creatina a creatinina con la formación de ATP, asociado a dos reacciones: una desfosforilación de la glucosa por la enzima hexoquinasa con ATP y la deshidrogenación de la glucosa-6-fosfato por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, usando como coenzima NADP⁺. Se valora la extinción por minuto de la reacción en los tiempos 2', 3', 4' y 5' tras la mezcla de 0,1 ml de la muestra (plasma con EDTA) y 2,5 ml de la solución reactiva (30 mmol/l fosfato de creatina, 2 mmol/l de ADP, 20 mmol/l de glucosa, 2 mmol/l de NADP⁺). La extinción por minuto se valora por la reducción de la absorbancia entre los tiempos dados, a una longitud de onda de 340 nm. La temperatura de ensayo fue de 30 °C

La actividad de la enzima CPK (U/I) se calcula multiplicando la extinción por minuto media de las tres medidas por 4127. Cuando la actividad enzimática es alta, el valor de la extinción por minuto a los 3 minutos es inferior a 0,25, en estos casos se mide de nuevo la reacción diluyendo 1/10 con una solución de NaCl al 0,9% y multiplicando la extinción por minuto media por 41270.

3.6.6 Metagenómica Análisis

3.6.6.1 Puesta a punto de la técnica

Inicialmente se desconocía la metodología idónea para obtener adecuadamente el genoma del microbiota intestinal de la *O. niloticus*. Por ello, antes de realizar el experimento, se puso a punto la técnica (Figura 3.26). Esta metodología presenta varios problemas que hay que tener en cuenta. El primer problema que se presenta es que el intestino contiene una gran cantidad de enzimas que deterioran el material genético (ADN

y ARN) así como inhibidores de la PCR. Para evitarlo se utilizaron las metodologías descritas por Zoetendal *et al.* (1998). Otro aspecto que hay que considerar es si se utilizan muestras frescas o congeladas, por eso se ensayaron los protocolos con muestras frescas y preservadas en RNAlater. Por otro lado, se ensayaron distintos protocolos de PCR, así como distintos cebadores (*primers*) de amplificación.

Figura 3. 26 Puesta a punto del protocolo de secuenciación de los genes marcadores del microbiota del intestino de *O. niloticus*. (A) Toma de muestras del intestino, (B) extracción, limpieza y extracción del contenido bacteriano del intestino, (C) lisis y extracción de ADN y amplificación del gen 16S-ARNr, (D) Ligación 16S-pGEM-T® Vector, (E) transformación *E. coli*, (F) cultivo de *E. coli* en LB+ampicilina y selección de colonias blancas (recombinantes), (G+H) extracción de plásmidos mediante el kit *high pure plasmid isolation miniprep* de Roche®; (Y) secuenciación de los insertos con los 16S-ARNr clonados; (J) revisión de las secuencias en la biblioteca on-line (NCIB); (K) identificación de los genes encontrados.

En la primera fase y para tomar decisiones sobre cuál era el mejor protocolo que se podía utilizar y para comprobar la viabilidad de las extracciones se decidió utilizar una metodología de secuenciación convencional basada en la clonación previa de los fragmentos de 16S-ARNr amplificados. Esta consiste en obtener material genético de la muestra y

amplificar por PCR el 16S-ARNr. Tras comprobar en gel de agarosa la amplificación se purifica el producto de PCR con el kit QIAquick PCR de QUIAGEN. Seguidamente, se utilizan células competentes de *Escherichia coli* (DH10B) para ser transformadas con una ligación del 16S-ARNr amplificado y purificado obtenido en el pGEM®-T Easy Vector. Este vector proporciona resistencia a ampicilina (Amp^R) y permite seleccionar mayoritariamente las colonias que han incorporado el fragmento del gen 16S-RNAr dentro de la región de policlonaje (Figura 3.27). Estas células de *E. coli* transformadas se cultivaron en placas con medio LB con ampicilina (0,1 mg/ml), a las que se añade 50 µl X-Gal como marcador de expresión. Transcurrido un día de cultivo en la placa se seleccionaron las colonias blancas. A partir de los cultivos de estas colonias blancas aisladas se extrajeron los plásmidos clonados mediante el kit *High pure plasmid isolation miniprep* de Roche. y se purificaron con kit QIAquick PCR de QUIAGEN. Finalmente, tras comprobar la presencia de los plásmidos en un gel de agarosa, estos se secuenciaron en Secugen S.L. y las secuencias obtenidas se compararon con la biblioteca online del NCIB.

Figura 3.27 Mapa del plásmido p-GEM®-T Easy Vector.

3.6.6.2 Obtención de ADN bacteriano

Tras la evaluación de los distintos protocolos de extracción del ADN bacteriano se decidió utilizar la metodología que se describe a continuación (Figura 3.28).

Figura 3.28 Esquema del protocolo de extracción del ADN de la microbiota intestinal de *O. niloticus* utilizado durante la tesis: (A) toma de muestras del intestino; (B) extracción, limpieza y extracción del contenido bacteriano del intestino; (C) lisis y extracción del ADN total; (D) amplificación del 16S-ARNr; (E) secuenciación en MiSeq de los amplicones 16S-ARNr; (F) ensamblaje de secuencias e identificación computacional con los programas Silva y QIIME.

3.6.6.2.1 Toma de muestras intestinales

Se seleccionaron 4 peces de cada tanque al azar (8 por tratamiento). Los intestinos se extrajeron asépticamente y las muestras de intestino se tomaron 1,0 cm de la parte distal del intestino a 1,0 cm de la cloaca. Este protocolo intenta evitar la heterogeneidad reportada al tomar muestras en diferentes áreas del intestino (Suzuki y Nachman, 2016). Las muestras se almacenaron en microtubos de 2 ml, marcados con el número de chip y procesados frescos, conservándolos a 4°C en hielo durante el proceso.

3.6.6.2.2 Aislamiento

Uno de los grandes problemas al utilizar muestras de intestino es la presencia de gran variedad de inhibidores de la PCR, incluyendo sales biliares (Lanz *et al.*, 1997). Por ello y tras probar con diferentes técnicas y revisar a fondo la bibliografía, las muestras se procesaron en fresco usando el Stool minikit de QIAamp (Qiagen, Crawley, United Kingdom) (Gajardo *et al.*, 2016; Dehler *et al.*, 2017; Gaikwad *et al.*, 2017; Huyben *et al.*, 2017; Torrecillas *et al.*, 2017) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Figura 3.29) para muestras de gran volumen (utilizando 10 ml de tampón ASL en lugar de 2 ml). Todas las muestras se dividieron en dos y se trataron por duplicado.

Figura 3.29 Esquema del procedimiento de extracción de ADN del Stool Mini Kit de QIAamp.

3.6.6.2.3 PCR

Los amplicones codificados en Bard de la región V1-V2 (~ 310 pb) de los genes 16S-ARNr se generaron por PCR usando el cebador 27F-DegS (GAG TTT GAT CMT GGC TCA G) y una mezcla equimolar de dos cebadores 338RI (GCW GCC TCC CGT AGG AGT) y 388RII (GCW CGC ACC CGT AGG TGT) (Fan *et al.*, 2013; Giatsis *et al.*, 2015; Gajardo *et al.*, 2016). El protocolo de PCR utilizó 100 ng de ADN total, 0,5 U de D N polimerasa Taq, tampón DMSO 2,5 mM, 5 µl de dNTP, 10 µl de Oligo 27F, 5 µl de Oligo 33 R I, 5 µl de Oligo 33 R I, en 50 µl de volumen final. El ciclo de PCR fue de 1 min 95°C, 45 s a 57°C y 45 s a 72°C en un termociclador Eppendorf, seguido de 30 ciclos de 45 s a 95°C, 30 s a 56°C y 30 s a 72°C para cerrar el ciclo a 4°C.

3.6.6.2.4 MiSeq

Las muestras fueron enviadas a Macrogen (República de Corea), dónde se usó el sistema MiSeq con la tecnología Illumina SBS para la secuenciación.

3.6.6.2.5 Estudio de los resultados

El estudio de los resultados obtenidos por la secuenciación se llevó a cabo con los programas QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) y Silvan (Ye *et al.*, 2014; Giatsis *et al.*, 2015; Gajardo *et al.*, 2016; Dehler *et al.*, 2017) y los índices de diversidad de la población se calcularon utilizando los métodos Simpson, Shannon y Chaos, utilizando el programa PAST (Hammer *et al.*, 2017; Huyben *et al.*, 2017, 2000).

$$\text{Shannon's index} = \sum_{i=1}^S -p_i \log_2(p_i) = H'$$

$$\text{Simpson's coefficient} = \sum_{i=1}^n \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

$$\text{Margalef's index} = \sum_{i=1}^n \frac{(s - 1)}{\ln N}$$

$$\text{Chaos 1 coefficient} = S + \frac{a^2}{2b}$$

S; Número de especies de la muestra.

p_i ; Proporción de individuos de cada especie i en el total de la muestra = n_i/N .

n_i ; Número de individuos de la especie i .

N ; Total de individuos.

b ; Especies que se representan con un solo individuo en la muestra (“singletons”).

a ; Número de especies que se representan por un par de individuos en la (“doubletons”).

3.7 Análisis estadístico

Todas las pruebas estadísticas se llevaron a cabo utilizando R.commander (R Core Team, 2013). Según la prueba de Shapiro/Wilk, los datos sobre la calidad del agua, el crecimiento y la supervivencia se distribuyeron normalmente y se analizaron utilizando un N OV de un solo sentido. Los datos de las pruebas de “*Two-Choices*” no siguieron una distribución normal y se analizaron usando una prueba de Kruskal-Wallis. El nivel de significación fue $P < 0,05$ en ambos casos.

Para el análisis taxonómico se utilizó el programa QIIME (97%) y se contrastaron con el programa Silva NGS. Se realizaron estudios de similitud de las muestras con el programa PAST (Hammer *et al.*, 2001), utilizando grupos de coeficientes de similitud de Bray-Curtis.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Experimentos con alevines de tilapia “Two-Choices”

4.1.1 Crecimiento y supervivencia de peces

Tanto el crecimiento como los índices de conversión durante el experimento realizado con los alevines de tilapia con dietas suplementadas y no suplementadas con *Arthrospira* fueron muy buenos, aunque no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre los dos tratamientos ni a los 30 días ni a los 50 días de experimento. Tampoco, se encontraron diferencias en cuanto a la longitud corporal total entre los dos tratamientos (cm, media $\pm$ DE, 4,13 $\pm$ 1,09 CTR, 4,22 $\pm$ 0,97 SPR), ni el coeficiente de variación en la longitud total (cm, media $\pm$ DE: 0,26 $\pm$ 0,08 CTR, 0,28 $\pm$ 0,08 SPR). Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas con respecto a la mortalidad ($p > 0,05$), que fue menor en alevines que recibieron una dieta con el 1% de *A. platensis* (Tabla 4.1). Cabe destacar que no se encontró ninguna concentración de la mortalidad en ningún día, ni en ningún tanque en particular, durante las revisiones diarias realizadas durante el experimento. Y que los datos de mortalidad en ambos casos se encuentran por debajo de los normales en industria del 33% según Meyer (2004).

Tabla 4.1 Resumen de las medias ($\pm$ S.E.) de los datos productivos de *O. niloticus* control y suplementado con *A. platensis* 1% para el peso inicial del tanque (PIT), la ganancia media del tanque (GMT), el índice de conversión (IC) y el % de supervivencia.

TRT	Control (n)	<i>A. platensis</i> (n)	p-Value
PIT (d0)	2,42 $\pm$ 0,53	2,6 $\pm$ 0,76	0,20
GMT (d30)	26,21 $\pm$ 2,57	26,07 $\pm$ 2,61	0,2
GMT (d50)	66,93 $\pm$ 7,15	70,55 $\pm$,33	0,32
IC (d30)	0,73 $\pm$ 0,07	0,74 $\pm$ 0,09	0,9
IC (d50)	0,3 $\pm$ 0,10	0,79 $\pm$ 0,07	0,40
% Srv (d30)	4,5 $\pm$ 7,23 ^a	93,5 $\pm$,0 ^b	0,04
% Srv (d50)	4,0 $\pm$ 6,76 ^a	93,0 $\pm$,50 ^b	0,03
% Srv (d30-50)	99,5 $\pm$ 1,54	99,5 $\pm$ 1,41	0,9

Valores seguidos por la misma letra superíndice en la misma fila no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$).

4.1.2 Prueba “Two-Choices”

En los resultados obtenidos durante la prueba de “Two-Choices”, se pudieron observar dos estilos de afrontamiento al estrés por hipoxia por parte de *O. niloticus*, con diferencias significativas entre los dos tratamientos ($p > 0,05$). Un número mayor de alevines suplementados con *A. platensis* adoptaron un estilo de afrontamiento proactivo, tomando un tiempo significativamente más largo para abandonar el Tanque A, a pesar de la disminución de los niveles de O_2 (Figura 4.1). Los peces control no solo abandonaron el Tanque A más rápidamente, sino que también mostraron mayor tendencia de hacerlo en grupos de dos o más peces. Mientras que los alevines suplementados con *A. platensis* que dejaron el Tanque A tendieron a hacerlo de forma individual ($p > 0,05$, ver Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Tiempo medio de salida del Tanque A y nivel de O_2 de los primeros cinco peces dividido por tratamiento, durante el desafío hipóxico en minutos, y el % de abandono grupal del Tanque A.

TRT	Tiempo medio de salida	Nivel O_2 medio de salida	Abandono grupal (%)
Control (n6)	17,35 ^a min	4,01 ^a ppm	7 ^a
<i>A. platensis</i> (n6)	30,20 ^b min	2, 3 ^b ppm	40 ^b
p-value	0,001	0,001	0,021

Valores seguidos por la misma letra superíndice en la misma columna no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$).

Figura 4.1 Tiempo de salida (min) de los primeros cinco peces por tratamiento, diferenciando entre los controles (●) y los suplementados con *A. platensis* (▲). La línea azul claro es la concentración de O_2 en ppm en el Tanque A. La línea azul oscuro es la curva de regresión obtenida con los datos de oxígeno medios durante la prueba, para conocer a qué nivel de O_2 respondió cada pez, (O_2 (ppm) = $1,78 + 6,19 \cdot 0,94^{t(\text{min})}$) ($r = 0,98$).

4.2 Engorde y calidad de la carne de tilapia

4.2.1 Crecimiento y supervivencia

No se encontraron diferencias en los parámetros de crecimiento durante la fase de adaptación (-22 a 0 días), cuando todos los peces fueron alimentados con dieta de control de mantenimiento (2% del peso vivo). Sin embargo, durante la fase de prueba (0 a 50 días) con un nivel de alimentación comercial a 3,5% del peso vivo (Tabla 4.3), los peces duplicaron su peso vivo durante la fase experimental. Aunque el número de tanques es limitado, la suplementación con 3% de *A. platensis* aumentó el crecimiento en un 10% en comparación con los controles y una GMD con un porcentaje similar de mejora.

Tabla 4.3 Parámetros de crecimiento, dos tanques por tratamiento y 25 peces por tanque, -22 días de ingreso a los tanques, 0 días de inicio de la prueba y 50 días de finalización del experimento. Abreviaturas: control (CTR); suplementados con *A. platensis* (SPR); ganancia media diaria (GMD) e índice de conversión (IC). ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Día	Parámetros de crecimiento	CTR (n=50)	SPR(n=50)	p-value
-22 d	Peso $\pm$ ME (-22 d) (g)	9,09 $\pm$ 3,74	90,5 $\pm$ 3,74	0,9
	Longitud $\pm$ ME (-22 d)	14,3 $\pm$ 0,20	14,51 $\pm$ 0,21	0,656
	Peso tanque (-22 d) (g)	2310,	2294,55	
0d	Peso $\pm$ ME (0 d) (g)	109,17 $\pm$ 4,19	109,06 $\pm$ 4,23	0,95
	GMD (0 d) (g/d)	0, $\pm$ 0,045	0,4 $\pm$ 0,05	0,572
	IC tanque (-22 a 0 d)	2,41	2,47	0,537
	Peso tanque (0 d) (g)	2793,00	2764,00	
50d	Peso $\pm$ ME (50 d) (g)	236,65 $\pm$ 9,73 ^b	259,39 $\pm$ 9,2 ^a	0,046
	Longitud $\pm$ ME (50d)	1,61 $\pm$ 0,23 ^b	19,41 $\pm$ 0,23 ^a	0,015
	GMD (50d) (g/d)	2,50 $\pm$ 0,13 ^b	2,95 $\pm$ 0,13 ^a	0,020
	IC tanque (0 a 50d)	1,37 ^b	1,14 ^a	0,007
	Peso tanque (50d) (g)	600,25	657,57	

Valores seguidos por la misma letra superíndice en la misma columna no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$).

4.2.2 Análisis de sangre

No hubo diferencias significativas en los niveles de CPK, lactato y glucosa, ni en el conteo del hematocrito o de los leucocitos entre los dos tipos de peces alimentados con o sin *Arthrospira*. Sin embargo, los peces alimentados con *A. platensis* mostraron valores significativamente superiores de triglicéridos (TAG) y cortisol (Tabla 4.4). Los niveles de TAG en los peces suplementados con *Arthrospira* eran casi el doble de los niveles en peces control.

Tabla 4.4 Resumen de los parámetros hematológicos de *O. niloticus* (Media $\pm$ SEM) y nivel de significancia en dos tratamientos diferentes de alimentación, control (CTR) y suplementado con *Arthrospira* (SPR). Los parámetros controlados fueron CPK (U /l), cortisol (μ g/dl), glucosa (mg/100 ml), hematocrito (%), triglicéridos (mg/100 ml), leucocitos (mil/ μ l) y lactato (mmol/l). ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

	CTR (n=20)	SPR (n=20)	p-value
CPK	3052,4 $\pm$ 409,3	3115,3 $\pm$ 414,5	0,839
Cortisol	10,10 $\pm$ 1,20 ^b	15,46 $\pm$ 1,50 ^a	0,019
Glucosa	89,23 $\pm$ 3,50	84,23 $\pm$ 3,60	0,571
Hematocrito	37,33 $\pm$ 1,10	37,39 $\pm$ 1,10	0,551
Triacilglicéridos	61,80 $\pm$ 8,71 ^b	110,50 $\pm$ 7,40 ^a	0,000
Leucocitos	8,68 $\pm$ 0,60	8,24 $\pm$ 0,60	0,296
Lactato	1,44 $\pm$ 0,10	1,43 $\pm$ 0,10	0,733

Valores seguidos por la misma letra superíndice en la misma columna no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$).

4.2.3 Calidad de la carne

Durante las primeras horas después del sacrificio (0 h y 6 h), no se encontraron diferencias entre los tratamientos en relación con el pH de la carne o el *rigor mortis*. Sin embargo, el ángulo de *rigor mortis* fue significativamente menor en los peces control a las 48 h *post mortem* (tabla 4.5).

Tabla 4.5 Media ($\pm$ SEM) del ángulo de *rigor mortis*, pH y temperatura ($^{\circ}$ C), de *O. niloticus* para dos tratamientos, alimento control (CTR) y suplementado con *A. platensis* (SPR). ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

	CTR (n=20)	SPR (n=20)	p-value
Alpha 0h	45,06 $\pm$ 1,26	42,08 $\pm$ 1,26	0,212
Alpha 6h	6,62 $\pm$ 1,98	8,32 $\pm$ 1,53	0,499
Alpha 24h	0,14 $\pm$ 0,14	0,12 $\pm$ 0,12	0,448
Alpha 48h	2,81 $\pm$ 0,81 ^b	11,46 $\pm$ 1,06 ^a	0,001
pH 0h	6,81 $\pm$ 0,04	6,84 $\pm$ 0,04	0,691
pH 6h	6,79 $\pm$ 0,02	6,73 $\pm$ 0,04	0,149
pH 24h	6,43 $\pm$ 0,02	6,37 $\pm$ 0,03	0,093

T^a 0h	22,38±0,30	20,41±0,79	0,098
T^a 6h	5,16±0,61	6,45±0,53	0,122
T^a 24h	5,14±0,32	5,43±0,35	0,542

Valores seguidos por la misma letra superíndice en la misma columna no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$).

Aunque no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos a 0 h, el parámetro L^* fue algo mayor en los peces suplementados. Transcurridas 24 h, se revirtió el color de la carne, con diferencias significativas en ambos parámetros a^* y b^* con niveles más altos para los peces suplementado con *A. platensis*. Mientras que C^* fue mayor para los peces control. No hubo diferencias significativas se encontraron en el parámetro L^* entre tratamientos.

Tabla 4.6 Media ($\pm$ SD) de los parámetros y color de la carne (L^* , a^* , b^* , chroma C^* and hue h^*) en *O. niloticus* control (CTR), y suplementados al 3% *A. platensis* (SPR).

Parámetros de color		CTR (n=20)	SPR (n=20)	p-values
L*	0h	47.33±2.72	49.30±3.60	0.06
	24h	48.95±1.65	49.08±1.49	0.79
a*	0h	-1.86±0.3	1.84±0.29	0.77
	24h	-1.78±0.35 ^b	-1.42±0.42 ^a	<0.01
b*	0h	-0.39±0.81	-0.739±0.71	0.16
	24h	-4.74±0.87 ^b	-4.26±0.61 ^a	0.05
C*	0h	2.06±0.35	2.09±0.32	0.78
	24h	5.09±0.75 ^a	4.51±0.57 ^b	<0.01
h*(°)	0h	12.96±22.15	21.40±18.86	0.33
	24h	68.70±6.30	71.50±6.28	0.17

Valores seguidos por la misma letra superíndice en la misma columna no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$).

Diferencias en la reflectancia fueron encontradas a diferentes longitudes de onda transcurridas 24 h *post mortem*. Los peces suplementados (SPR) presentaron una mayor reflectividad de la luz en los rangos de 470-500 nm y 620-670 nm (Figura 4.4 y tabla 4.7).

Tabla 4.7 Espectro de reflectancia diferencial de la carne de *O. niloticus* en % a 24 h tras el sacrificio (Media). Para dos tratamientos distintos, control (CTR) y suplementada al 3% de *A. platensis* (SPR). ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Wavelength	CTR(n=20)	SPR(n=20)	p-value
360 nm	22,64±1,47	23,14±1,22	0,24
370 nm	22,64±1,47	23,14±1,22	0,24
380 nm	22,64±1,47	23,14±1,22	0,24
390 nm	22,64±1,47	23,14±1,22	0,24

400 nm	22,64±1,47	23,14±1,22	0,24
410 nm	19,58±1,47	20,03±1,14	0,27
420 nm	17,69±1,45	18,10±1,08	0,32
430 nm	17,44±1,45	17,84±1,15	0,33
440 nm	18,14±1,30	18,48±1,31	0,43
450 nm	19,71±1,34	20±10±1,47	0,39
460 nm	21,06±1,19	21,78±1,18	0,10
470 nm	21,23 ±1,18 ^b	22,14±1,51 ^a	0,04
480 nm	20,87±1,19 ^b	21,84±1,53 ^a	0,03
490 nm	20,22±1,18 ^b	21,22±1,52 ^a	0,03
500 nm	19,52±1,16 ^b	20,45±1,50 ^a	0,04
510 nm	18,86±1,15	19,68±1,51	0,06
520 nm	18,15±1,12	18,90±1,50	0,08
530 nm	17,47±1,08	18,23±1,40	0,07
540 nm	16,73±1,05	17,46±1,41	0,07
550 nm	16,09±1,06	16,72±1,40	0,11
560 nm	15,83±1,04	16,48±1,40	0,10
570 nm	15,75±1,02	16,49±1,39	0,06
580 nm	15,86±1,14	16,65±1,43	0,05
590 nm	16,05±1,14	16,82±1,56	0,08
600 nm	16,11±1,24	16,85±1,66	0,12
610 nm	16,40±1,33	17,27±1,78	0,09
620 nm	16,76±1,43 ^b	17,88±1,93 ^a	0,04
630 nm	16,88±1,48 ^b	18,11±2,03 ^a	0,04
640 nm	16,87±1,51 ^b	18,11±2,06 ^a	0,04
650 nm	16,93±1,55 ^b	18,16±2,09 ^a	0,03
660 nm	16,99±1,57 ^b	18,21±2,10 ^a	0,04
670 nm	17,11±1,58 ^b	18,21±2,11 ^a	<0,05
680 nm	17,28±1,60	18,47±1,59	0,06
690 nm	17,46±1,61	18,64±2,10	0,06
700 nm	17,69±2,11	18,84±2,11	0,06
710 nm	17,69±1,60	18,84±2,12	0,06
720 nm	17,69±1,60	18,84±2,12	0,06
730 nm	17,69±1,60	18,84±2,12	0,06
740 nm	17,69±1,60	18,84±2,12	0,06

Valores seguidos por la misma letra superíndice en la misma columna no presentaron diferencias significativas (P > 0,05).

Figura 4.2 Curvas de espectro reflectancia de la carne de *O. niloticus* sp. a 0 h y 24 h tras el sacrificio. Para dos tratamientos distintos, control (CTR) y suplementada al 3% de *A. platensis* (SPR). Las barras marcan los rangos donde se encontró diferencia significativa en la reflectancia (%) entre tratamientos a las 24 h.

4.2.4 Microbiota intestinal

En el conjunto de los experimentos del microbiota intestinal se obtuvieron 5470272 lecturas de secuencia, correspondientes a 1563 especies, de las 16 muestras de intestino utilizadas (8 por tratamiento), obteniendo los datos Krona (Figura 4.4) de cada uno de los especímenes que se puede consultar en el anexo (Anexo 2).

Figura 4.3 Gráfica jerárquica en Krona, nivel de especie, de uno de los individuos de la prueba. Identificados con las siglas del tratamiento SPR (suplementados con *A. platensis*) y con los cuatro dígitos de su chip.

Para estimar la diversidad microbiana de cada muestra, se calculó el estimador de riqueza (Chao-1) y los índices de diversidad (Shannon, Margalef y Simpson), tomando como opción una cobertura del 97% de similitud en el BAST (Tabla 4.8). A partir de estos análisis se pudo concluir que no se encontraron diferencias significativas del microbiota intestinal de los peces alimentados con o sin *Arthrospira*.

Tabla 4.8 Índices de diversidad calculados por el software QIIME. Las unidades taxonómicas operativas (OTU) se definen al 97% de similitud de secuencia. *O. niloticus* en dos tratamientos, control (CTR) y suplemento 3% con *A. platensis* (SPR). ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Tratamiento (chip)	Taxones	Lecturas	Simpson 1-D	Shannon H	Margalef	Chao-1
CTR (056A)	71	209538	0,92	3,66	58,11	774,30
CTR (13B6)	431	441930	0,84	2,93	33,08	498,30
CTR (CEE9)	384	246371	0,60	1,73	30,85	500,20
CTR (CEEB)	469	307394	0,84	2,72	37,04	531,90
CTR (E0BD)	592	355241	0,78	2,68	46,24	679,10
CTR (FF98)	498	169468	0,76	2,47	41,28	588,40
CTR (FF9B)	429	387646	0,84	2,92	33,26	520,90
CTR (FF9B)	592	357727	0,81	2,57	46,22	664,90
SPR (055B)	412	365829	0,84	2,85	32,08	466,50
SPR (3331)	515	200177	0,80	2,44	42,11	606,70
SPR (3E31)	385	349497	0,75	2,52	30,08	431,50
SPR (3FAA)	558	423622	0,93	3,75	42,99	690,00
SPR (CEEF)	356	456785	0,79	2,55	27,24	406,40
SPR (D415)	607	437080	0,74	2,41	46,66	681,80
SPR (FB22)	332	286631	0,70	1,75	26,34	393,10
SPR (FFDC)	466	475336	0,85	2,91	35,57	541,10
CTR (media)	513,50	309414	0,80	2,71	40,76	594,75
SPR (media)	453,88	374369	0,80	2,65	35,38	527,14
p-value	0,766	0,188	0,977	0,825	0,225	0,246

Los resultados de la Figura 4.5, muestran la composición de la comunidad bacteriana encontrada en el intestino de los distintos especímenes de *O. niloticus*. Si se estudia a nivel global, está compuesta mayoritariamente por cuatro phylas. Estos phylas en término medio corresponden a Protobacterias que representa el 36,5 %, Fusobacterias el 32,8%, con un 10,6 % se encuentra Actinobacterias y un 5,9% de Bacteriodetes. Estos porcentajes varían considerablemente entre individuos. Tres de las muestras control presentan un nivel alto de Actinobacterias, y dos de las muestras suplementadas con *A. platensis* contenían valores que superan el 35%. Por otro lado, géneros como *Spirochaetae*, *Euryarchaeota* o *Hydrogenedentes* solo aparecen en peces suplementados con *A. platensis*, aunque su representación es menor de 0,05% de la población total.

Figura 4.4 Abundancia relativa, nivel *phyla*, de bacterias encontradas en el intestino de 16 individuos *O. niloticus* en dos tratamientos alimentados diferentes, 8 individuos con dieta control (CTR) y 8 individuos suplementados con *A. platensis* (SPR), incluyendo medias por tratamiento y media total.

Revisando los resultados en mayor profundidad, a nivel de género, encontramos una situación similar (Figura 4.5), donde 15 géneros representan más del 75% del total encontrado. Los 4 géneros más representativos, bajo las condiciones experimentales, fueron *Cetobacterium* (32,8%), seguido de *Aeromonas* (13,9%), *Echerichia/Shingella* (6,7%) y finalmente encontramos a *Propionibacterium* (5,2%). Sin embargo, encontramos divergencia en las muestras con patrones más altos en Actinobacteria. *Propionibacterium* se encuentra por encima del 30% en los individuos con el chip CTR056A y SPR3FAA. Así como en concentraciones de entorno al 10% en los individuos CTRFF98 y CTRFF9B, donde hay una Actinobacteria dominante. Finalmente es *Mycobacterium* la bacteria dominante en el individuo SPR3331 con un 37,8%, siendo estos géneros bacterianos los responsables de la diferencia de estas muestras.

Figura 4.5 Abundancia media relativa, nivel género, de bacterias encontradas en el intestino de 16 individuos *O. niloticus* en dos tratamientos alimentados diferentes, 8 individuos con dieta control (CTR) y 8 individuos suplementados con *A. platensis* (SPR).

El estudio de la diversidad alfa (Tabla 4) mostró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. También se realizó un agrupamiento (Figura 3) para analizar la diversidad β , pero no hubo diferencias en la diversidad bacteriana entre los tratamientos.

Figura 4.1 Análisis de similitud por grupos de bacterias intestinales, a nivel de especie, de 8 individuos *O. niloticus* en dos tratamientos diferentes. Peces con alimento control (CTR) y con alimento suplemento con *A. platensis* (SPR) y número de chip, usando la prueba de Bray-Curtis (software PAST3, 2017.)

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

5.1 Prueba 1 Alevinaje y *Two-Choices*

5.1.1 Crecimiento y supervivencia

En la Prueba 1, agregar 1% de *A. platensis* a la alimentación no afectó a los índices de producción (IC, GMD) en comparación con los controles. Esto contradice los estudios previos de James *et al.* (2006) usando *X. helleri* (8% de suplementación), y de Abdel-Tawwab y Ahmed (2009) (0,5% a 1% de suplementación en tilapia), Kim *et al.* (2013) en *Oplegnathus fasciatus* (5-10%), y lo observado en nuestro experimento con peces de pre-engorde (3% de suplementación) donde se observó una mejora del crecimiento.

Los resultados obtenidos en supervivencia, aunque son mejores en ambos casos que los estimados por Meyer (2004) de un 33% en producciones comerciales. Los resultados muestran una tasa de un 9% mayor en peces suplementados con *A. platensis*. Esto concuerda con otros estudios que encuentran un 6% de supervivencia más alta con 1% de suplementación de *Arthrospira* después de un desafío bacteriano (Ibrahim *et al.*, 2013). En alevines de *Cyprinus carpio* (carpa común), alimentada con *Arthrospira*, Ramakrishnan *et al.* (2008) obtuvieron una mejora de un 3% tanto en crecimiento como en supervivencia. Sin embargo, Boonyaratpalin y Unprasert (1989), Abdel-Tawwab y Ahmed (2009), y Ungsethaphand *et al.* (2010) no observaron diferencias en la supervivencia entre los peces alimentados con *Arthrospira* en comparación con los controles. En alevines de trucha arcoíris (*O. mykiss*) ni Pókniak (2007) ni Dallaire *et al.* (2007) tampoco encontraron diferencias significativas en cuanto a la supervivencia, así como Wang *et al.* (2006) en adultos de *Hyphessobrycon callistus*,

Los animales jóvenes a menudo tienen un sistema inmune deficiente durante las primeras semanas de vida (Belay *et al.*, 1996). Un número significativo de las larvas de peces marinos, generalmente mueren debido a infecciones por patógenos oportunistas. El desarrollo temprano del sistema inmune puede ofrecer protección contra estos patógenos. *Arthrospira* o sus extractos pueden acelerar el desarrollo del sistema inmune de estos animales, especialmente durante las primeras etapas de sus vidas.

Cuando comenzó el ensayo las tilapias se encontraban en la etapa de alevines (alrededor de 2-3 cm de longitud corporal). En esa etapa los peces son más sensibles a la mortalidad puesto que comienzan cambios en su dieta. Los alevines comienzan a cambiar de omnívoros a carnívoros, pues necesitan un mayor aporte proteico para su crecimiento. Más tarde, vuelven a cambiar a fitoplanctívoro, a unos 6-7 cm (Ibrahim *et al.*, 2013). El cambio a carnívoro podría aumentar el canibalismo y el estrés jerárquico reduciendo la supervivencia de alevines más débiles (Berrios y Snow, 1983). En este escenario, el alto contenido de vitaminas y proteínas de *A. platensis* podría haber jugado un papel importante, ayudando a promover el crecimiento y a disminuir la mortalidad.

Los datos obtenidos en crecimiento y supervivencia, conducen a pensar que el suplemento con *Arthrospira* se comporta como un promotor del crecimiento cuando las condiciones del medio no son del todo adecuadas, siendo inocua en situaciones favorables.

5.1.2 *Two-choices*

Con respecto a la prueba de *two-choices*, los resultados sugieren que un mayor número de alevines suplementados con *A. platensis* adoptaron un estilo proactivo de afrontamiento al estrés por hipoxia. Muchos de ellos permanecieron en un ambiente estresante a pesar de la posibilidad de escape. Como sugieren Barreto *et al.* (2011), los peces que permanecen en el tanque "estresante" tienen una menor reacción al estrés y pueden clasificarse como proactivos. Algunos autores han demostrado que *A. platensis* afecta los niveles plasmáticos de cortisol y de glucosa. En la trucha arco iris (*O. mykiss*), el cortisol y la glucosa disminuyeron significativamente con el aumento de la inclusión de *A. platensis* entre 0 y 10% en la dieta (Yeganeh *et al.*, 2015), aunque los análisis realizados en esta tesis con *O. niloticus* en pre-engorde muestran un aumento en los niveles de cortisol en los peces suplementados con *A. platensis*. Aunque esos niveles no se salían de los rangos normales descritos para la especie en la bibliografía.

En el esturión (*Huso huso*), Adel *et al.* (2016) encontraron que la glucosa en sangre aumentó con una mayor inclusión de *A. platensis* (10%). Además, según Delarue (2003), agregar ácidos grasos $\omega 3$ a las dietas de los peces puede inhibir la activación suprarrenal provocada por el estrés psicológico. *Arthrospira* tiene un alto nivel de ácidos grasos de cadena larga insaturados, como $\omega 3$ y $\omega 6$, que pueden haber proporcionado un efecto similar en *O. niloticus*. En los análisis hematológicos realizados en la prueba de pre-engorde

encontramos un aumento en los niveles de triglicéridos en los peces suplementados con *A. platensis*.

En este sentido, Anzola (2013) encontró una disminución en el estrés psicológico con una mayor ingesta de triptófano en perros, y Shor-Posner (1994) encontró el mismo efecto en humanos con suplementos de triptófano y vitamina B6. *A. platensis* contiene triptófano (1,5% de MS) y vitamina B6 (900 ppm de MS, Fernández-Cardenas *et al.*, 2001)). Teniendo en cuenta que el requerimiento de triptófano de *O. niloticus* es el 1% de la dieta; con la inclusión de 1% de *A. platensis* (1.5 %), se aumenta hasta un 1.15%. Los requerimientos de vitamina B6 en juveniles *Oreochromis* son de 15 a 16 ppm de la dieta (Shiau y Hsieh, 1997), pero se aumentó a 9 ppm (50% más que los niveles de control estimados) mediante la adición de 1% de *A. platensis*.

Durante la prueba de *two-choice* se expuso a los peces a una situación que puede aparecer en una producción comercial, la falta de oxígeno. Debido a varios factores, como la rotura de una bomba, la sobrepoblación de peces o exceso de bacterias que reduzcan drásticamente y por periodos variables de tiempo la disponibilidad de O₂. Que *Arthrospira* pueda paliar el estrés producido por estas situaciones, que puede resolverse en un alto número de bajas, puede hacer rentable su inclusión en los piensos.

En los peces, la longitud del cuerpo es un fuerte predictor de posiciones individuales en una jerarquía (Ward *et al.*, 2006). Los peces grandes son presumiblemente más proactivos, dominantes. Pero durante la prueba, no encontramos ningún indicio de que el tamaño del pez esté involucrado en su respuesta.

5.2 Prueba 2, Pre-engorde

5.2.1 Engorde

La suplementación con *A. platensis* mejoró las tasas de crecimiento, GMD y IC en tilapia SPR. Esto está en sintonía con lo observado por otros autores y en diferentes especies. Adel *et al.* (2016) en *H. huso* (suplemento de 10%), James *et al.* (2006) en *X. helleri* (8%), Güroy *et al.* (2012) en ciclidos de cola amarilla (*Pseudotropheus acei*), y Abdel Tawwab *et al.* (2009) en *O. niloticus* (5%). Sin embargo, Tukeuchi (2002) reportó lo opuesto, una menor tasa de crecimiento y eficacia de la alimentación más pobre en *Oreochromis* alimentado con *Arthrospira*.

Estos resultados, son similares a los encontrados por varios investigadores en porcino. En ganado porcino la suplementación con *Arthrospira* con respecto a la respuesta al crecimiento es inconsistente. Hugh *et al.* (1985) encontraron que los cerdos destetados mestizos que recibían suplementos dietéticos de *Arthrospira* tenían tasas de crecimiento de hasta un 9% más alta que sus pares no suplementados. Sin embargo, Grinstead *et al.* (1998) no encontraron diferencias de crecimiento entre los cerdos suplementados con *Arthrospira* y los no suplementados. Este hallazgo aparentemente contradictorio es atribuible a las diferencias en los procedimientos experimentales. Una explicación a esta inconsistencia es la salud de los cerdos, un resultado casual que puede afectar al resultado de los experimentos. Por otro lado, también puede ser causado por el alimento al que reemplaza *Arthrospira* en cada uno de los casos. Por ejemplo, se ha demostrado que la *Arthrospira* es un sustituto viable de la leche en polvo desnatada en raciones de alimento para cerdos (Grinstead *et al.*, 1998).

En general nuestros resultados apoyan la idea que *Arthrospira* ayuda a promover el crecimiento animal. Como se demuestra en *broilers* (pollos de engorde), donde la investigación con *Arthrospira* en pienso ha sido más intensa, los resultados están más claros. Con la inclusión de entre 5-10% conservan las tasas de crecimiento, pero sustituciones mayores del 20% parecen empeorarlas (Ross y Dominy, 1990; Venkataraman *et al.*, 1994; Saxena *et al.*, 1983; Toyomizu *et al.*, 2001). Venkataraman *et al.* (1994) encontraron que se pueden eliminar los complementos minerales y vitamínicos cuando se incluye *Arthrospira* en los piensos, disminuyendo así los costes de producción. Los pollos crecen más con 1 % de suplemento de *Arthrospira* (Shanmugapriya *et al.*, 2015).

El género *Arthrospira sp.* se presenta como un suplemento dietético que tiene muchos beneficios para la salud y un aditivo para animales con beneficios económicos (Kaoud 2012). *A. platensis* es una cianobacteria filamentosa azul verdosa que no fija N₂ que tiene un gran potencial para mejorar el suministro de alimentos y tiene varias características fisiológicas valiosas (Huili *et al.*, 2013), debido a una cantidad importante en proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales, ácidos grasos vitales y polisacáridos. Recientemente, muchos autores concluyeron que la suplementación de SP mejoró la ganancia de peso corporal (GPC), el índice de conversión alimenticia (IC) y el aumento de la altura de las vellosidades (Shanmugapriya *et al.*, 2015).

5.2.2 *Análisis sanguíneo*

Dentro de los parámetros sanguíneos, las diferencias ($p < 0.05$) obtenidas en los niveles de triglicéridos y cortisol fueron mayores en ambos casos en peces suplementados. Los triglicéridos en la sangre están relacionados con el metabolismo de las grasas y, a su vez, con el nivel de ejercicio y la dieta. Teniendo en cuenta que los peces han estado sujetos a condiciones idénticas, no parece el caso. Niveles más altos de triacilglicéridos plasmáticos también fueron encontrados por Velásquez (2016) en tilapias alimentadas con diferentes niveles de *Arthrospira*. Esto parece mostrar que la suplementación con *Arthrospira* en tilapias aumenta el nivel plasmático de triglicéridos.

Los niveles de cortisol en los peces están comúnmente relacionados con sus niveles de estrés (Barton y Iwama., 1991; Pottinger y Carrick., 1999). Aunque los niveles eran mayores en los peces suplementados, están dentro de los rangos normales en la especie (sobre 10-20 ng/ml, Balm, 1994; Vijayan *et al.*, 1997, Barcellos *et al.*, 1999). En respuesta a la mayoría de los estresores, los peces exhibirán un aumento en las concentraciones plasmáticas de cortisol, que generalmente viene seguido de una elevación en los niveles de glucosa en plasma. Sin embargo, en el estudio actual, esto no sucedió. No se encontraron diferencias en los niveles de glucosa entre los diferentes tratamientos. Los estudios en trucha arco iris (*O. mykiss*), han encontrado una reducción de cortisol y glucosa con la suplementación con *A. platensis* (0 a 10 %; Yeganeh *et al.*, 2015).

Por otro lado, el cortisol también está relacionado con el aumento de la lipólisis del sistema adiposo, que genera un aumento de triglicéridos en la sangre. Este aumento en los niveles plasmáticos de ácidos grasos durante la hipercortisolemia puede mejorar las reacciones metabólicas observadas para varias especies de peces (Mommsen *et al.*, 1999). Este aumento en el metabolismo está relacionado con el crecimiento y puede ser una de las causas de las diferencias en el crecimiento entre los tratamientos. El cortisol no solo es un componente esencial de la respuesta al estrés en peces, sino que también desempeña un papel importante en la osmorregulación, el crecimiento y la reproducción (Mommsen *et al.*, 1999).

Esto respalda lo encontrado también en otras especies. En conejos alimentados con *Arthrospira* (Peiretti y Meineri, 2011), encontraron un aumento significativo en el contenido de grasa de la canal. En peces de cola de espada roja (*X. helleri*) a los que se les administró 8% de *A. platensis*, aumento el peso de las gónadas y el número de crías (James

et al., 2006). En porcino (Granaci 2007), y en rumiantes también se ha reportado una mejora de la eficiencia reproductiva en animales alimentados con esta bacteria.

5.2.3 *Calidad de la carne*

El pH de la carne analizada estuvo dentro de los valores normales para *O. niloticus* entre 6.4-7.0, según lo descrito por otros autores (Oliveira *et al.*, 2015; Hsieh *et al.*, 2011). No hubo efecto de la suplementación en el pH de la carne, pero el *rigor mortis* se resolvió antes en los peces suplementados, lo que podría implicar una vida útil más corta.

El color de la carne también fue diferente entre los tratamientos, con un croma más alto a las 24 h *post-mortem* en los peces control. A las 24 h *post-mortem*, hubo una mayor absorción de luz en los rangos de 470-500 nm, que se corresponde con el espectro de absorción del β -caroteno. El caroteno muestra dos picos de absorbancia entre 400 nm y 500 nm (que reflejan la luz roja-naranja-amarilla). Este cambio de color debido a los carotenos también ha sido descrito por otros autores en *O. mykiss* (Teimouri *et al.*, 2013), *C. carpio* L. (Sun *et al.*, 2012) y *O. mossambicus* (Gomes *et al.*, 2012). James *et al.* (2006) también encontraron un mayor contenido de caroteno en *X. helleri* alimentado con 8 % de *Arthrospira*. En Ciclidos de cola amarilla (*P. acei*), Güroy *et al.* (2012) también encontraron que los peces alimentados con esta bacteria presentaban mejor coloración en el amarillo de la cola.

El segundo rango (620-670 nm) podría corresponderse con la ficocianina que emite fluorescencia a aproximadamente 650 nm. Karadal *et al.* (2017) encontraron un aumento en la coloración de la piel de los cíclidos de Kenyi (*Maylandia lombardoi*) alimentados con *Arthrospira*.

El estudio realizado por Regunathan y Wesley (2006) en camarones (*Fenneropenaeus indicus*). Confirma que la biodisponibilidad pigmentos y carotenoides de *Arthrospira*, y su inclusión regular en la dieta evita los problemas relacionados con síndrome de deficiencia de pigmentos en los reproductores.

5.2.4 *Microbiota intestinal*

El microbiota intestinal se puede entender como un "órgano extra" debido a su papel clave en el desarrollo intestinal, la homeostasis y la protección. El microbiota intestinal influye en una amplia gama de procesos biológicos de su huésped, incluyendo digestión, inmunidad, crecimiento, acciones de barrera intestinal y el desarrollo en todos los vertebrados (O'Hara y Shanahan, 2006; Dhanasiri *et al.*, 2011; Dehler *et al.*, 2017; Backhed *et al.*, 2004; Turnbaugh *et al.*, 2006). Por todo esto, es un factor a tener en cuenta, para mejorar el bienestar de los individuos, así como la rentabilidad de las producciones.

Aunque en números estudios con *Arthrospira* (Belay *et al.*, 1996; Lui *et al.*, 2011; Nuhu, 2013) informan de actividades anticancerígenas y antimicrobianas (antibacterianas, antifúngicas y antivirales) a través de la producción de ficocianina, aloficocianina, y otros productos valiosos. En nuestro estudio la suplementación con *A. platensis* no modificó significativamente el microbiota intestinal en *O. niloticus*. El microbiota identificado en los peces de la prueba, fue similar a los controles y dentro del rango de otros estudios realizados en *Oreochromis* por otros autores (Fan *et al.*, 2017; Ran *et al.*, 2016; Giatsis *et al.* 2015).

A nivel de *phyla*, predominan las Proteobacteria y Fusobacteria (Fan *et al.*, 2017; Ran *et al.*, 2016), aunque en Giatsis *et al.* (2015), menciona que Acidobacteria ocupó el nicho de las Proteobacteria, dominando la población. Encontramos resultados similares en las muestras CTR-056A, CTR-FF98, CTR-FF9B, SPR-3331 y SPR-3FAA. Esto parece mostrar la existencia de dos ecotipos de microbiota intestinal (Figura 5.1). A nivel de género, casi todas las secuencias de 16S ARNr de Fusobacteria en los dos tratamientos pertenecían al género *Cetobacterium*. Este resultado es similar a van Kessel *et al.* (2011) en *C. carpio*, y Ran *et al.* (2016) en *O. niloticus*, donde fue el grupo dominante para cada tratamiento, representando el 32%. Las Cetobacterias son miembros conocidos del microbiota endógeno de los intestinos de los peces (Wu *et al.*, 2010).

Figura 5.1 Análisis de similitud de grupos de bacterias intestinales de diferentes estudios en *Oreochromis* usando la prueba de Bray-Curtis. Utilizando los datos medios de los contribuidos por el control de peces de los diversos estudios realizados por los autores.

En este estudio, *Fusobacteria* representó el 36%, mientras que otros autores como Fan *et al.* (2017) encontraron 26%, Zhai *et al.* (2017) 56%, Gaikwad *et al.* (2017) 45% o Ran *et al.* (2016) 34%. Aunque no todas las muestras del presente estudio respondieron a este patrón, los altos valores de *Fusobacteria* parecen característicos de *Oreochromis*, especialmente en comparación con otras especies como *H. molitrix* <12% (Ye *et al.*, 2014), *S. salar* <7% (Gajardo *et al.*, 2016; Dehler *et al.*, 2017) u *O. mykiss* <1% (Huyben *et al.*, 2017). Merrifield y Ringo (2014) argumentaron que el contenido promedio de *Fusobacteria* en peces comerciales comunes es inferior al 7%.

Sin embargo, las *Proteobacterias* fueron los *phyla* más numerosos, divididos en una gran cantidad de género, el más representativo fue *Aeromonas* (13,8%), un miembro conocido de la microbiota endógena de peces de agua dulce, que ayuda a fermentar compuestos orgánicos y celulosa (Wu *et al.*, 2010), seguido de *Shigella* (6,7%), que puede ser un patógeno opcional como *Aeromonas* (Wu *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2011; van Kessel *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012).

Entre los géneros más representativos de *Actinobacteria* se encuentran *Propionibacterium* (5.2%) y *Mycobacterium* (2.7%), ambos miembros del orden de los *Actinomycetales*, ocupando el nicho principal del segundo ecotipo encontrado.

Está claro que la alimentación suplementaria de *Arthrospira* ofrece algunos beneficios a los peces. Algunos de estos efectos, como la mayor tasa de crecimiento, la mejora del color y la calidad general del tejido, pueden ser efectos nutricionales. En este estudio demuestra que la aplicación de 1% *A. platensis* en la dieta de *O. niloticus*, no afecta a la composición del microbiota intestinal. Sin embargo, el hecho de que las tasas de crecimiento mejoren incluso con un 1% de suplemento. Lo que puede sugerir la presencia de sustancias que pueden imitar los efectos o estimular la producción de hormonas de crecimiento. Otros efectos como los efectos inmunomoduladores, los efectos antivirales y anticancerígenos se producen a concentraciones tan bajas que sus efectos pueden deberse a factores distintos de los meramente nutricionales.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

6.1 Crecimiento

A nivel general podemos concluir; que el género *Arthrospira* sp. se presenta como un suplemento dietético que tiene muchos beneficios para la salud. Y como aditivo puede presentar mejoras en aspectos que tienen interés económico.

Aunque, la suplementación, con *Arthrospira* al 1%, no mejoró la ganancia de peso corporal (GPC), el índice de conversión alimenticia (IC), durante la fase de alevinaje. Si, mejoro considerablemente los índices de supervivencia de los alevines en un 9%. Lo que se puede reflejar en una mayor producción final. Además, la suplementación con *A. platensis* mejoró la ganancia media diaria (GMD) en un 10%, y el índice de conversión alimenticia (IC) en un porcentaje similar. A nivel comercial, y bajo nuestros parámetros de la tesis, en individuos en la fase de pre-engorde.

6.2 Comportamiento y estrés

Complementando alevines de *O. niloticus* con *A. platensis* aumentó la supervivencia y la proporción de individuos que adoptaron un estilo de afrontamiento proactivo, basado en los resultados de una prueba de dos opciones. Los resultados también sugieren que *A. platensis* aumentó la resistencia a la hipoxia, que es importante para la producción acuícola intensiva.

Por otro lado, la suplementación con *A. platensis*, no parece interferir en la mayoría de los parámetros sanguíneos. Aunque, bajo las condiciones de la tesis, *Arthrospira* parece generar una hipercortisolemia, relacionada con el aumento de la lipólisis del sistema adiposo, que genera un aumento de triglicéridos en la sangre. Este aumento en el metabolismo está relacionado con un mayor crecimiento y puede ser una de las causas de las diferencias en el crecimiento entre los tratamientos.

6.3 Calidad de la carne

El estudio de colorimetría, parece sugerir que los pigmentos contenidos en *Arthrospira* (xantofila, β -caroteno, ficocianina y astaxantina, así como ficocianina), se fijan en la grasa y carne afectando su coloración, lo que aumenta el valor nutricional del producto. En cuanto al *rigor mortis*, la suplementación con *Arthrospira*, parece estar relacionada con un período de duración más corto, que puede estar relacionado con una reducción de la vida útil de la carne.

6.4 Efecto del suplemento de *espirulina* sobre el microbiota intestinal de la tilapia.

A nivel de microbiota intestinal, y sobre la base de los resultados de este estudio, concluimos que *A. platensis* puede mejorar el crecimiento en *O. niloticus* y podría ayudar a mejorar el color de la carne, sin modificar los parámetros generales del microbiota intestinal. Por otro lado, hemos observado diferentes configuraciones de microbiota intestinal en *O. niloticus*, que podemos categorizar en dos ecotipos. El predominante en nuestras muestras es el Ecotipo I (Fuso-Proteobacteria), con *Cetobacterium* como la bacteria dominante, y el Ecotipo II (Proteo-Actinobacteria) con las Proteobacterias dominantes *Escherichia/Shigella* y *Aeromonas* y la Actinobacteria *Mycobacterium* que ocupa el nicho principal.

BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Tawwab, M., Hagra, A. E., Elbaghdady, H. A. M., & Monier, M. N. (2015). Effects of dissolved oxygen and fish size on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): growth performance, whole-body composition, and innate immunity. *Aquaculture international*, 23(5), 1261-1274. (<https://doi.org/10.1007/s10499-015-9882-y>)
- Abdel-Tawwab, M., & Ahmad, M. H. (2009). Live Spirulina (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 40(9), 1037-1046. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02195.x>)
- Abdulqader, G., Barsanti, L., & Tredici, M. R. (2000). Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 493-498. (<https://doi.org/10.1023/A:1008177925799>)
- Adel, M., Yeganeh, S., Dadar, M., Sakai, M., & Dawood, M. A. (2016). Effects of dietary Spirulina platensis on growth performance, humoral and mucosal immune responses and disease resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Fish & shellfish immunology*, 56, 436-444. (<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.003>)
- Al-Batshan, H. A.; Al-Mufarrej, S. I.; Al-Homaidan, A. A.; Qureshi, M. A., 2001: Enhancement of chicken macrophage phagocytic function and nitrite production by dietary Spirulina platensis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 23, 281-289. (<https://doi.org/10.1081/IPH-100103866>)
- Anderson, D. W., Tang, C. S., & Ross, E. (1991). The xanthophylls of Spirulina and their effect on egg yolk pigmentation. *Poultry Science*, 70(1), 115-119. (<https://doi.org/10.3382/ps.0700115>)
- Anzola, B., Ibanez, M., Morillas, S., Benedetti, R., Perez, J., & Farias, D. (2013). The Use of Tryptophan in Shelter Dogs to Treat Stress-related Anxiety Disorders. *Revista científica-facultad de ciencias veterinarias*, 23(1), 26-32.
- Bacha, F. (2015). Las algas en la alimentación animal rumiantes. *NutriNews*.Nº 2015. 119.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., ...& Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15718-15723. (<https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>)
- Baker, R. T. M., Pfeiffer, A. M., Schöner, F. J., & Smith-Lemmon, L. (2002). Pigmenting efficacy of astaxanthin and canthaxanthin in fresh-water reared Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Animal Feed Science and Technology*, 99(1-4), 97-106. ([https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00116-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00116-5))
- Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A. R., & Ahmadi, K. (2011). Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(1), 1-6. (<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.09.001>)
- Barandica, C. L. M., & Tort, L. (2008). Neuroendocrinología e inmunología de la respuesta al estrés en peces. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, 32(123), 267-284.

- Barcellos, L. J., Nicolaiewsky, S., De Souza, S. M., & Lulhier, F. (1999). The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquaculture Research*, 30(11-12), 7 -892. (<https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00419.x>)
- Barreto, R. E., & Volpato, G. L. (2011). Ventilation rates indicate stress-coping styles in Nile tilapia. *Journal of Biosciences*, 36(5), 851-855. (<https://doi.org/10.1007/s12038-011-9111-4>)
- Barry, T. P., Lapp, A. F., Kayes, T. B., & Malison, J. A. (1993). Validation of a microtitre plate ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquaculture*, 117(3-4), 351-363. ([https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90331-R](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90331-R))
- Barton, B. A. (2011). Stress in finfish: Past, present and future-a historical perspective (pp. 1-34). Cambridge, UK: Cambridge University Press. (PMCID:PMC4781257) .
- Barton, B. A., & Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1, 3-26. ([https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G))
- Belal, E. B., & El-Hais, A. M. A. (2012). Use of spirulina (*Arthrospira fusiformis*) for promoting growth of Nile Tilapia fingerlings. *African Journal of Microbiology Research*, 6(35), 6423-6431. (<https://doi.org/10.5897/AJMR12.288>)
- Belay, A., & Gershwin, M. E. (2007). Spirulina (*Arthrospira*). In *Spirulina in Human Nutrition and Health* (pp. 11-35). CRC Press. (<https://doi.org/10.1201/9781420052572>)
- Bennett, P. M., Weber, L. P., & Janz, D. M. (2007). Comparison of Chloroform–Methanol-Extracted and Solvent-Free Triglyceride Determinations in Four Fish Species. *Journal of aquatic animal health*, 19(3), 179-185. (<https://doi.org/10.1577/H06-044.1>)
- Bermejo-Poza, R., De la Fuente, J., Pérez, C., Lauzurica, S., González, E., Díaz, M. T., & Villarroel, M. (2015). The effect of intermittent feeding on the pre-slaughter fasting response in rainbow trout. *Aquaculture*, 443, 24-30. (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.007>)
- Berrios-Hernandez, J. M., & Snow, J. R. (1983). Comparison of methods for reducing fry losses to cannibalism in Tilapia production [Freshwater food fishes, predation, Cichlidae]. The Progressive fish culturist-United States, Fish and Wildlife Service (USA). ([https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1983\)45\[116:COMFRF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1983)45[116:COMFRF]2.0.CO;2))
- Beveridge, M. C. M., & Baird, D. J. (2000). Diet, feeding and digestive physiology. In *Tilapias: Biology and exploitation* (pp. 59-87). Springer, Dordrecht. (https://doi.org/10.1007/978-94-011-4008-9_3)
- Bezerra, L. R., Silva, A. M. A., Azevedo, S. A., Mendes, R. S., Manguiera, J. M., & Gomes, A. K. A. (2010). Performance of Santa Inês lambs submitted to the use of artificial milk enriched with Spirulina platensis. *Ciência Animal Brasileira*, 11(2), 258-263.
- BOE (2013). Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *BOE*, 34, 11370-11421.

- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Dijkstra, J., Issa-Zacharia, A., Van Nespen, T., Van Straalen, W., & Fievez, V. (2008). Effect of dietary starch or micro algae supplementation on rumen fermentation and milk fatty acid composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4714-4727. (<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1178>)
- Broom, D. M. (1986). Indicators of poor welfare. *British veterinary journal*, 142(6), 524-526. ([https://doi.org/10.1016/0007-1935\(86\)90109-0](https://doi.org/10.1016/0007-1935(86)90109-0))
- Boonyaratpalin, M., & Unprasert, N. (1989). Effects of pigments from different sources on colour changes and growth of red *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 79(1-4), 375-380.
- Carvalho, T. B., Mendonça, F. Z., Costa-Ferreira, R. S., & Gonçalves-de-Freitas, E. (2013). The effect of increased light intensity on the aggressive behavior of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Zoologia (Curitiba)*, 30(2), 125-129.
- Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J., & Esteban, M. Á. (2008). Effects of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune parameters. *Fish & Shellfish Immunology*, 24(5), 663-668. (<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.10.002>)
- Chamorro, G., & Salazar-Jacobo, M. (1995). Toxicología de la Spirulina. *Tecnología de alimentos*, 30, 13-14.
- Chamorro, G., Salazar, M., Gomes de Lima Araújo, K., Pereira dos Santos, C., Ceballos, G., & Fabila Castillo, L. (2002). Actualización en la farmacología de Spirulina (*Arthrospira*), un alimento no convencional. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52(3), 232-240.
- Chao, A., & Lee, S. M. (1992). Estimating the number of classes via sample coverage. *Journal of the American statistical Association*, 87(417), 210-217. (<https://doi.org/10.1080/01621459.1992.10475194>)
- Christaki, E., Karatzia, M., Bonos, E., Florou-Paneri, P., & Karatzias, C. (2012). Effect of dietary Spirulina platensis on milk fatty acid profile of dairy cows. *Asian J. Anim. Vet. Adv*, 7, 597-604. (<https://doi.org/10.3923/ajava.2012.597.604>)
- Ciferri, O. (1983). Spirulina, the edible microorganism. *Microbiological Reviews*, 47(4), 551.
- Cohen (2014). The chemicals of Spirulina. In Vonshak, A. (Ed.). (2014). *Spirulina platensis arthrospira: physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press.
- Conte, F. S. (2004). Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 86(3), 205-223. (<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.003>)
- Curtis, S. E. (1985). What constitutes animal well-being? In *Animal stress* (pp. 1-14). Springer, New York, NY. (https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7544-6_1)
- Dale, N. M., Zumbado, M., Gernat, A. G., & Romo, G. (2004). Nutrient value of tilapia meal. *Journal of applied poultry research*, 13(3), 370-372. (<https://doi.org/10.1093/japr/13.3.370>)
- Dallaire, V., Lessard, P., Vandenberg, G., & de la Noüe, J. (2007). Effect of algal incorporation on growth, survival and carcass composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Bioresource Technology*, 98(7), 1433-1439.
- Dantzer, R., & Mormède, P. (1983). Stress in farm animals: a need for reevaluation. *Journal of Animal Science*, 57(1), 6-18. (<https://doi.org/10.2527/jas1983.5716>)

- Davis, M. W. (2010). Fish stress and mortality can be predicted using reflex impairment. *Fish and Fisheries*, 11(1), 1-11. (<https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2009.00331.x>)
- de Jesus Raposo, M. F., de Moraes, A. M. M. B., & de Moraes, R. M. S. C. (2016). Emergent sources of prebiotics: seaweeds and microalgae. *Marine Drugs*, 14(2), 27. (<https://doi.org/10.3390/md14020027>)
- Dehler, C. E., Secombes, C. J., & Martin, S. A. (2017). Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 467, 149-157. (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.017>)
- Delarue, J. O. C. P., Matzinger, O., Binnert, C., Schneiter, P., Chiolerio, R., & Tappy, L. (2003). Fish oil prevents the adrenal activation elicited by mental stress in healthy men. *Diabetes & metabolism*, 29(3), 289-295. ([https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(07\)70039-3](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(07)70039-3))
- Delbon, M. C. E., & Paiva, M. J. T. R. (2012). Eugenol em juvenis de tilápia do Nilo: concentrações e administrações sucessivas. *Boletim do Instituto de Pesca*, 38(1), 43-52.
- Dhaneshwar, S., Tewari, K., Joshi, S., Godbole, D., & Ghosh, P. (2011). Diglyceride prodrug strategy for enhancing the bioavailability of norfloxacin. *Chemistry and physics of lipids*, 164(4), 307-313. (<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.03.006>)
- EC, 2003. Regulation N° 1831/2003 of the European Parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrient. *Official Journal of the European Union*, 43. [Lex - 32003R183]
- El-Haroun, E. R., Goda, A. S., & Chowdhury, K. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37(14), 1473-1480. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01584.x>)
- EL-Khaldi, A. T. (2010). Effect of different stress factors on some physiological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Saudi journal of biological sciences*, 17(3), 241-246. (<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.04.009>)
- Ellis, T., James, J. D., Stewart, C., & Scott, P. (2004). non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 65(5), 1233-1252. (<https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00499.x>)
- El-Sheekh, M., El-Shourbagy, I., Shalaby, S., & Hosny, S. (2014). Effect of Feeding *Arthrospira platensis* (Spirulina) on Growth and Carcass Composition of Hybrid Red Tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(2), 471-478. (https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_2_18)
- Evans, F. D., & Critchley, A. T. (2014). Seaweeds for animal production use. *Journal of applied phycology*, 26(2), 891-899. (<https://doi.org/10.1007/s10811-013-0162-9>)
- Fan, L., Chen, J., Meng, S., Song, C., Qiu, L., Hu, G., & Xu, P. (2017). Characterization of microbial communities in intensive GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) pond systems during the peak period of breeding. *Aquaculture Research*, 48(2), 459-472. (<https://doi.org/10.1111/are.12894>)
- FAO, 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.

- Fernández-Cárdenas, T., González-San Miguel, H. V., & Travieso, L. (2001). Determinación de vitaminas del Complejo B en *Arthrospira maxima* por cromatografía líquida de alta resolución.
- Fitzsimmons, K. (1997). Introduction to tilapia nutrition. In Tilapia aquaculture. The International Symposium on Tilapia in aquaculture. ICLARM Conferences Proceedings, Florida (pp. 9-12).
- Fletcher, T. C. (1997). Dietary effects on stress and health. Fish stress and health in aquaculture, 62, 223-246.
- Fortes-Silva, R., Martínez, F. J., Villarroel, M., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2010). Daily rhythms of locomotor activity, feeding behavior and dietary selection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 156(4), 445-450. (<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.03.031>)
- Fraser, D., Weary, D. M., Pajor, E. A., & Milligan, B. N. (1997). A scientific conception of animal welfare that reflects ethical concerns.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. International journal of food microbiology, 141, S15-S28. (<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031>)
- Gaikwad, S. S., Shouche, Y. S., & Gade, W. N. (2017). Deep Sequencing Reveals Highly Variable Gut Microbial Composition of Invasive Fish Mossambicus Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Collected from Two Different Habitats. Indian Journal of Microbiology, 57(2), 235-240. (<https://doi.org/10.1007/s12088-017-0641-9>)
- Gajardo, K., Rodiles, A., Kortner, T. M., Krogdahl, Å., Bakke, A. M., Merrifield, D. L., & Sørum, H. (2016). A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research. Scientific Reports, 6, 30893. (<https://doi.org/10.1038/srep30893>)
- Garcia, A., Tume, J., & Juárez, V. (2012). Determinación de los parámetros de crecimiento de la Tilapia Nilótica (*Oreochromis niloticus*) en un estanque revestido con geomembrana y abastecido con agua de subsuelo. Ciencia y Desarrollo, 15(2), 47-55. (<https://doi.org/10.21503/cyd.v15i2.1127>)
- Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Heilig, H., Benvenuti, G., Verreth, J., & Verdegem, M. (2015). The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. Scientific reports, 5, 18206. (<https://doi.org/10.1038/srep18206>)
- Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Verreth, J., & Verdegem, M. (2014). The colonization dynamics of the gut microbiota in tilapia larvae. PLoS One, 9(7), e103641. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103641>)
- Gitelson, A., Qiuang, H., & Richmond, A. (1996). Photic Volume in Photobioreactors Supporting Ultrahigh Population Densities of the Photoautotroph *Spirulina platensis*. Applied and Environmental Microbiology, 62(5), 1570-1573.
- Gomes, I. G., Chaves, F. H., Barros, R. N., Moreira, R. L., Teixeira, E. G., Moreira, A. G., & Farias, W. R. (2012). Dietary supplementation with *Spirulina platensis* increases growth and color of red tilapia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 25(3), 462-471.

- Gouveia, L., Batista, A. P., Raymundo, A., & Bandarra, N. M. (2008). Microalgae in novel food products. *Food Chemistry Research Developments*, 75-112.
- Granaci, V. (2007). Achievements in the artificial insemination of swine. *Bulletin of 360 University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal 361 Science and Biotechnologies* 63/64, 382-386.
- Granados, A. I., Garduño, M., & Muñoz, C. (2002). Comparación de crecimiento y evaluación económica entre el genotipo de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) y el híbrido rojo (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*). Recuperada de http://www.ecologia.edu.mx/sigolfo/pagina_n2.htm.
- Green Bartholomew, W. (1995). Polyculture of Tilapia with marine shrimp. Department of Fisheries and allied aquacultures. Alabama USA. In *Acta del primer simposio centroamericano sobre cultivo de tilapia* (pp. 117-127).
- Grigorakis, K. (2007). Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture*, 272(1-4), 55-75. (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.062>)
- Grinstead, G. S., Tokach, M. D., Dritz, S. S., Goodband, R. D., & Nelssen, J. L. (2000). Effects of *Spirulina platensis* on growth performance of weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 83(3-4), 237-247. ([https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00130-3))
- Grisdale-Helland, B., Helland, S. J., & Gatlin III, D. M. (2008). The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 283(1-4), 163-167. (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.012>)
- G r oy, B., Şahin, İ., Mantoğlu, S., & Kayalı, S. (2012). *Spirulina* as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail cichlid *Pseudotropheus acei*. *Aquaculture International*, 20(5), 869-878.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Paleontological statistics software: package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, (4) 9.
- Haygood, A. M., & Jha, R. (2016). Strategies to modulate the intestinal microbiota of Tilapia (*Oreochromis sp.*) in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*. (<https://doi.org/10.1111/raq.12162>)
- Henrikson, R. (1989). *Earth food spirulina*. Laguna Beach, CA: Ronore Enterprises, Inc, 187.
- Henrique, M. M. F., Gomes, E. F., Gouillou-Coustans, M. F., Oliva-Teles, A., & Davies, S. J. (1998). Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 161(1-4), 415-426. (<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb00292.x>)
- Hsieh, C. W., Lai, C. H., Lee, C. H., & Ko, W. C. (2011). Effects of High-Voltage Electrostatic Fields on the Quality of Tilapia Meat during Refrigeration. *Journal of food science*, 76(6). (<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02218.x>)
- Hugh, W. I. (1985). Evaluation of dehydrated spirulina (*Spirulina platensis*) as a protein replacement in swine starter diets (No. 04; USDA, FOLLETO 3093.).

- Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V. A., Kadri, S., Pottinger, T. G., Sandøe, P., & Turnbull, J. F. (2006). Current issues in fish welfare. *Journal of fish biology*, 68(2), 332-372. (<https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2006.001046.x>)
- Hussain, M. G., Rao, G. P. S., Humayun, N. M., Randall, C. F., Penman, D. J., Kime, D., ...& McAndrew, B. J. (1995). Comparative performance of growth, biochemical composition and endocrine profiles in diploid and triploid tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 138(1-4), 87-97. ([https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01079-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01079-3))
- Huyben, D., Nyman, ., Vidaković, ., Passoth, V., Moccia, R., Kiessling, ., & Lundh, T. (2017). Effects of dietary inclusion of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus* on gut microbiota of rainbow trout. *Aquaculture*, 473, 528-537. (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.024>)
- I.I.M.S.A.M. (2012). The Intergovernmental Institution for the Use of Micro-algae Spirulina sp. Against Malnutrition. Disponible en: <http://www.iimsamSpirulina.sp.pLEDge.org/isp/nutritionalbenefits.aspx#>
- Ibrahim, M. D., Mohamed, M. F., & Ibrahim, M. A. (2013). The role of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) in growth and immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its resistance to bacterial infection. *Journal of Agricultural Science*, 5(6), 109. (<https://doi.org/10.5539/jas.v5n6p109>)
- Iwata, K., Inayama, T., & Kato, T. (1990). Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose-induced hyperlipidemic rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 36(2), 165-171. (<https://doi.org/10.3177/jnsv.36.165>)
- James, R., Sampath, K., Thangarathinam, R., Vasudevan, I., (2006). Effects of dietary spirulina level on growth, fertility, coloration and leucocyte count in red swordtail, *Xiphophorus helleri*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 58 (2), 97–104.
- Kaoud, H. A. (2015). Effect of *Spirulina platensis* as a dietary supplement on broiler performance in comparison with prebiotics *Scientific Journal of Applied Research*, 1: 44-48.
- Karadal, O., Güroy, D., & Türkmen, G. (2017). Effects of feeding frequency and *Spirulina* on growth performance, skin coloration and seed production on kenya cichlids (*Maylandia lombardoi*). *Aquaculture International*, 25(1), 121-134. (<https://doi.org/10.1007/s10499-016-0017-x>)
- Khanzadeh, M., Fereidouni, A. E., & Berenjestanaki, S. S. (2016). Effects of partial replacement of fish meal with *Spirulina platensis* meal in practical diets on growth, survival, body composition, and reproductive performance of three-spot gourami (*Trichopodus trichopterus*) (Pallas, 1770). *Aquaculture International*, 24(1), 69-84. (<https://doi.org/10.1007/s10499-015-9909-4>)
- Kim, S. S., Rahimnejad, S., Kim, K. W., & Lee, K. J. (2013). Partial replacement of fish meal with *Spirulina pacifica* in diets for parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13(2).
- Koh, C. B., Romano, N., Zahrah, A. S., & Ng, W. K. (2016). Effects of a dietary organic acids blend and oxytetracycline on the growth, nutrient utilization and total cultivable gut microbiota of the red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and resistance to *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Research*, 47(2), 357-369. (<https://doi.org/10.1111/are.12492>)

- Korhonen, R. W., Lanier, T. C., & Giesbrecht, F. (1990). An evaluation of simple methods for following rigor development in fish. *Journal of Food Science*, 55(2), 346-348. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb06759.x>)
- Kulpys, J., Paulauskas, E., Pilipavicius, V., & Stankevicius, R. (2009). Influence of cyanobacteria *Arthrospira* (Spirulina) platensis biomass additive towards the body condition of lactation cows and biochemical milk indexes. *Agronomy Research*, 7, 823-835.
- Lantz, P. G., Matsson, M., Wadström, T., & Rådström, P. (1997). Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 28(3), 159-167. ([https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(97\)00979-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(97)00979-2))
- Laursen, D. C., Olsén, H. L., de Lourdes Ruiz-Gomez, M., Winberg, S., & Höglund, E. (2011). Behavioural responses to hypoxia provide a non-invasive method for distinguishing between stress coping styles in fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 132(3), 211-216. (<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.03.011>)
- Leal, B. E. S., Prado, M. R., Grzybowski, A., Tiboni, M., Koop, H. S., Scremin, L. B., ... & Fontana, J. D. (2017). Potential prebiotic oligosaccharides from aqueous thermopressurized phosphoric acid hydrolysates of microalgae used in treatment of gaseous steakhouse waste. *Algal Research*, 24, 138-147. (<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.020>)
- Liu, W., Yang, Y., Zhang, J., Gatlin, D. M., Ringø, E., & Zhou, Z. (2014). Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil. *British Journal of Nutrition*, 112(1), 15-29. (<https://doi.org/10.1017/S0007114514000610>)
- López-Luna, J., Bermejo-Poza, R., Bravo, F. T., & Villarroel, M. (2016). Effect of degree-days of fasting stress on rainbow trout, K. *Aquaculture*, 462, 109-114. (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.017>)
- Lu, J., Takeuchi, T., & Ogawa, H. (2003). Flesh quality of tilapia *Oreochromis niloticus* fed solely on raw Spirulina. *Fisheries Science*, 69(3), 529-534. (<https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2003.00653.x>)
- Liu, J. G., Hou, C. W., Lee, S. Y., Chuang, Y., & Lin, C. C. (2011). Antioxidant effects and UVB protective activity of Spirulina (*Arthrospira platensis*) products fermented with lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, 46(7), 1405-1410.
- Lyons, P. P., Turnbull, J. F., Dawson, K. A., & Crumlish, M. (2017). Effects of low-level dietary microalgae supplementation on the distal intestinal microbiome of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 48(5), 2438-2452. (<https://doi.org/10.1111/are.13080>)
- Mancera, J. M., & del Río, M. D. P. M. (2002). El sistema de estrés en peces teleósteos. *Encuentros en la Biología*, (78), 3.
- Masser, M. P., Rakocy, J., & Losordo, T. M. (2000). Recirculating aquaculture tank production systems. Southern Regional Aquaculture Center.
- Maximino, C., Marques, T., Dias, F., Cortes, F. V., Taccolini, I. B., Pereira, P. M., ... & Valéria, S. (2007). A comparative analysis of the preference for dark environments in five teleosts. *International Journal of Comparative Psychology*, 20(4).

- Maza, L. R., Guevara, M., Arredondo-Vega, B., Gómez, B., Licett, B., & Freitas, L. (2011). Contenido de lípidos, ácidos grasos, exopolisacáridos y minerales de *Arthrospira maxima* cultivada en fotobiorreactores1. *Agronomía Tropical*, 61(3-4), 231-240.
- McCarty, M. F. (2007). Clinical potential of Spirulina as a source of phycocyanobilin. *Journal of Medicinal Food*, 10(4), 566-570. (<https://doi.org/10.1089/jmf.2007.621>)
- Mendl, M. (2001). Animal husbandry: assessing the welfare state. *Nature*, 410(6824), 31. (<https://doi.org/10.1038/35065194>)
- Merrifield, D. L., & Ringo, E. (Eds.). (2014). *Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics*. John Wiley & Sons. (<https://doi.org/10.1002/9781118897263>)
- Meyer, D. (2004). *Introducción a la Acuicultura*. Mimeo. Zamorano, Honduras: Panamerican Agriculture School.
- Meyer, J. L., Sale, M. J., Mulholland, P. J., & Poff, N. L. (1999). Impacts of climate change on aquatic ecosystem functioning and health. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 35(6), 1373-1386. (<https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.1999.tb04222.x>)
- Michl, S. C., Ratten, J. M., Beyer, M., Hasler, M., LaRoche, J., & Schulz, C. (2017). The malleable gut microbiome of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Diet-dependent shifts of bacterial community structures. *PloS One*, 12(5), e0177735. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177735>)
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., & Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9(3), 211-268. (<https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>)
- Montero, D., Robaina, L. E., Socorro, J., Vergara, J. M., Tort, L., & Izquierdo, M. S. (2001). Alteration of liver and muscle fatty acid composition in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles held at high stocking density and fed an essential fatty acid deficient diet. *Fish Physiology and Biochemistry*, 24(1), 63-72. (<https://doi.org/10.1023/A:1011145426543>)
- Moriarty, C. M., & Moriarty, D. J. W. (1973). Quantitative estimation of the daily ingestion of phytoplankton by *Tilapia nilotica* and *Halochromis nigripinnis* in Lake George, Uganda. *Journal of Zoology*, 171(1), 15-23. (<https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1973.tb07513.x>)
- Mosenthin, R., & Bauer, E. (2000). The potential use of prebiotics in pig nutrition. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 13(Special iss.), 315-325.
- Nandeesh, M. C., Gangadhara, B., Manissery, J. K., & 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*. *Bioresource Technology*, 80(2), 117-120. ([https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00085-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00085-2))
- Nuhu, A. A. (2013). Spirulina (Arthrospira): An important source of nutritional and medicinal compounds. *Journal of Marine Biology*, 2013. (<http://dx.doi.org/10.1155/2013/325636>)
- O'Sullivan, L., Murphy, B., McLoughlin, P., Duggan, P., Lawlor, P. G., Hughes, H., & Gardiner, G. E. (2010). Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. *Marine Drugs*, 8(7), 2038-2064. (<https://doi.org/10.3390/md8072038>)

- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7(7), 688-693. (<https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>)
- Oliveira Filho, P. R. C., Oliveira, C. A. F., Sobral, P. J. A., Balieiro, J. C. C., Natori, M. M., & Viegas, E. M. M. (2015). How Stunning methods affect the quality of Nile tilapia meat. *CyTA-Journal of Food*, 13(1), 56-62. (<https://doi.org/10.1080/19476337.2014.911211>)
- Ortuno, J., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (2003). The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 14(2), 145-156. (<https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0428>)
- Paniagua-Michael, J., Dujardin, E., & Sironval, C. (2004). Crónica Azteca: El tecuitlatl, concentrado de algas espirulinas fuente de proteínas comestibles del pueblo de los Aztecas.
- Panjaitan, T., Quigley, S. P., McLennan, S. R., & Poppi, D. P. (2010). Effect of the concentration of *Spirulina* (*Spirulina platensis*) algae in the drinking water on water intake by cattle and the proportion of algae bypassing the rumen. *Animal Production Science*, 50(6), 405-409. (<https://doi.org/10.1071/AN09194>)
- Patterson, J. A., & Burkholder, K. M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 82(4), 627-631. (<https://doi.org/10.1093/ps/82.4.627>)
- Pedrotti, F. S., Davies, S., Merrifield, D. L., Marques, M. R. F., Fraga, A. P. M., Mouriño, J. L. P., & Fracalossi, D. M. (2015). The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of dietary carbohydrates. *Aquaculture Research*, 46(2), 472-481. (<https://doi.org/10.1111/are.12195>)
- Peiretti, P. G., & Meineri, G. (2008). Effects of diets with increasing levels of *Spirulina platensis* on the performance and apparent digestibility in growing rabbits. *Livestock Science*, 118(1), 173-177. (<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.04.017>)
- Peiretti, P. G., & Meineri, G. (2011). Effects of diets with increasing levels of *Spirulina platensis* on the carcass characteristics, meat quality and fatty acid composition of growing rabbits. *Livestock Science*, 140(1), 218-224. (<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2011.03.031>)
- Penninks, A., Baert, K., Levorato, S., & Binaglia, M. (2017). Dyes used in aquaculture. *EFSA Journal*, 15(7).
- Phang, S. M., Miah, M. S., Yeoh, B. G., & Hashim, M. A. (2000). *Spirulina* cultivation in digested sago starch factory wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 395-400. (<https://doi.org/10.1023/A:1008157731731>)
- Pickering, A. D. (1998). Stress responses of farmed fish. *Biology of Farmed Fish*, 222-255.
- Pickering, A. D., & Christie, P. (1981). Changes in the concentrations of plasma cortisol and thyroxine during sexual maturation of the hatchery-reared brown trout, *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology*, 44(4), 487-496. ([https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(06\)80043-3](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(06)80043-3))
- Pickering, A. D., & Pottinger, T. G. (1995). Biochemical effects of stress. In *Biochemistry and molecular biology of fishes* (Vol. 5, pp. 349-379). Elsevier. ([https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(06\)80043-3](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(06)80043-3))

- Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., & Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(8), 781-796. (<https://doi.org/10.1007/s10295-013-1281-7>)
- Pókniak, J. (2007). Incorporación de *Espirulina (Spirulina Maxima)* en dietas para alevines de truchas arco iris (*Oncorhynchus Mykiss*). *Avances en Ciencias Veterinarias*, 22(1-2). (Doi:10.5354/0719-5273.2010.911).
- Poli, B. (2009). Farmed fish welfare-suffering assessment and impact on product quality. *Italian Journal of Animal Science*, 8(sup1), 139-160. (<https://doi.org/10.4081/ijas.2009.s1.139>)
- Pottinger, T. G., & Carrick, T. R. (1999). Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. *General and comparative endocrinology*, 116(1), 122-132. (<https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7355>)
- Powers, D. A. (1980). Molecular ecology of teleost fish hemoglobins: strategies for adapting to changing environments. *American Zoologist*, 139-162. (<https://doi.org/10.1093/icb/20.1.139>)
- Quevedo, H. J. M., Quintana, M., Almares, A., & Hernández, L. (1999). Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de la *Chlorella vulgaris*. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. 13, 123-128.
- Quigley, S. P., Poppi, D. P., & McLennan, S. R. (2009). Strategies to increase growth of weaned Bali calves. *Australian Centre for International Agricultural Research*, Canberra. 1-90
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available at www.r-project.org. [21 September 2013].
- Ramakrishnan, C. M., Haniffa, M. A., Manohar, M., Dhanaraj, M., Arockiaraj, A. J., & Arunsingh, S. V. (2008). Effects of probiotics and spirulina on survival and growth of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Israeli Journal of Aquaculture* Bamidgheh (<http://hdl.handle.net/10524/19247>)
- Ramírez, L., & Olvera, R. (2006). Conocimiento acerca del alga *Spirulina (Arthrospira)*. *Interciencia*, 31(9), 1-5.
- Ran, C., Huang, L., Hu, J., Tacon, P., He, S., Li, Z., ...& Zhou, Z. (2016). Effects of dietary live and heat-inactive baker's yeast on growth, gut health, and disease resistance of Nile tilapia under high rearing density. *Fish & Shellfish Immunology*, 56, 263-271. (<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.07.001>)
- Raoof, B., Kaushik, B. D., & Prasanna, R. (2006). Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. *Biomass and Bioenergy*, 30(6), 537-542. (<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.09.006>)
- Regunathan, C., & Wesley, S. G. (2006). Pigment deficiency correction in shrimp broodstock using *Spirulina* as a carotenoid source. *Aquaculture Nutrition*, 12(6), 425-432. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2006.00444.x>)
- Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T. Ø., Dalmo, R. A., Amlund, H., HEMRE, G. I., & Bakke, A. M. (2010). Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 117-136. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x>)

- Ross, E., & Dominy, W. (1990). The nutritional value of dehydrated, blue-green algae (*Spirulina plantensis*) for poultry. *Poultry Science*, 69(5), 794-800. (<https://doi.org/10.3382/ps.0690794>)
- Ross, E., Puapong, D. P., Cepeda, F. P., & Patterson, P. H. (1994). Comparison of freeze-dried and extruded *Spirulina platensis* as yolk pigmenting agents. *Poultry Science*, 73(8), 1282-1289. (<https://doi.org/10.3382/ps.0731282>)
- Sandoval-Gío, J. J., Rosado-Vallado, M., & Rodríguez-Canul, R. (2013). Efectos individuales de la ciclidogiriasis y estreptococosis inducidas en la bioquímica sanguínea de la tilapia *Oreochromis niloticus*. *Hidrobiológica*, 23(3), 328-339.
- Saxena, P. N., Ahmad, M. R., Shyam, R., & Amla, D. V. (1983). Cultivation of *Spirulina* in sewage for poultry feed. *Experientia*, 39(10), 1077-1083. (<https://doi.org/10.1007/BF01943117>)
- Shanmugapriya, B., Babu, S. S., Hariharan, T., Sivanesarwan, S., & Anusha, M. B. (2015). Dietary administration of *Spirulina platensis* as probiotics on growth performance and histopathology in broiler chicks. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(2), 2650-3.
- Sharma S, Charma S, Sharma KP: Protective role of *Spirulina* feed in freshwater fish (*Poecilia reticulata* Peters) exposed to an azo dye-methyl red. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2005;3:1165–1169
- Shiau, S. Y., & Hsieh, H. L. (1997). Vitamin B6 requirements of tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* fed two dietary protein concentrations. *Fisheries Science*, 63(6), 1002-1007. (<https://doi.org/10.2331/fishsci.63.1002>)
- Shimamatsu, H. (2004). Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hydrobiologia*, 512(1-3), 39-44. (<https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000020364.23796.04>)
- Shimkiene, A., Bartkeviciute, Z., Chernauskienė, J., Shimkus, A., Chernauskas, A., Ostapchuk, A., & Nevitov, M. (2010). The influence of *Spirulina platensis* and concentrates on lambs' growth. *Zhivotnov'dni Nauki*, 47(1), 9-14.
- Shor-Posner, G., Feaster, D., Blaney, N. T., Rocca, H., Mantero-Atienza, E., Szapocznik, J., ...& Baum, M. K. (1994). Impact of vitamin B6 status on psychological distress in a longitudinal study of HIV-1 infection. *The International Journal of Psychiatry in Medicine*, 24(3), 209-222. (<https://doi.org/10.2190/7VD8-DA67-8T9L-UCHL>)
- Šimkus, A., Oberauskas, V., Laugalis, J., Želvytė, R., Monkevičienė, I., Sederevičius, A., ...& Pauliukas, K. (2007). The effect of weed *Spirulina platensis* on the milk production in cows. *Vet. Zootech*, 38, 74-77.
- Šimkus, A., Oberauskas, V., Laugalis, J., Želvytė, R., Monkevičienė, I., Sederevičius, A., ...& Pauliukas, K. (2007). The effect of weed *Spirulina platensis* on the milk production in cows. *Veterinarija ir Zootechnika*, 38, 74-77.
- Sommer, T. R., D'Souza, F. M. L., & Morrissy, N. M. (1992). Pigmentation of adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture*, 106(1), 63-74.
- Sommer, T. R., Potts, W. T., & Morrissy, N. M. (1991). Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 94(1), 79-88. ([https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90250-O](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90250-O))

- Sørensen, C., Johansen, I. B., & Øverli, Ø. (2013). Neural plasticity and stress coping in teleost fishes. *General and comparative endocrinology*, 181, 25-34. ([https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90130-Y](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90130-Y))
- Sujatha, T., & Narahari, D. (2011). Effect of designer diets on egg yolk composition of 'White Leghorn'hens. *Journal of food science and technology*, 4 (4), 494-497. (<https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2012.12.003>)
- Sumpter, J. P. (1997). The endocrinology of stress. *Fish stress and health in aquaculture*, 819, 95-118. (<https://doi.org/10.1007/s13197-010-0132-z>)
- Sun, X., Chang, Y., Ye, Y., Ma, Z., Liang, Y., Li, T., ...& Luo, L. (2012). The effect of dietary pigments on the coloration of Japanese ornamental carp (koi, *Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 342, 62-68. (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.019>)
- Suzuki, T. A., & Nachman, M. W. (2016). Spatial heterogeneity of gut microbial composition along the gastrointestinal tract in natural populations of *house mice*. *PloS One*, 11(9), e0163720. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163720>)
- Takashi, S. (2003). Effect of administration of Spirulina on egg quality and egg components. *Animal Husbandry*, 57, 191-195.
- Takeuchi, T., Lu, J., Yoshizaki, G., & Satoh, S. (2002). Effect on the growth and body composition of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* fed raw Spirulina. *Fisheries Science*, 68(1), 34-40. (<https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00386.x>)
- Teimouri, M., Amirkolaie, A. K., & Yeganeh, S. (2013). The effects of Spirulina platensis meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 396, 14-19. (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.009>)
- Torrecillas, S., Mompel, D., Caballero, M. J., Montero, D., Merrifield, D., Rodiles, A., ...& Izquierdo, M. (2017). Effect of fishmeal and fish oil replacement by vegetable meals and oils on gut health of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 468, 386-398. (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.005>)
- Toyomizu, M., Sato, K., Taroda, H., Kato, T., & Akiba, Y. (2001). Effects of dietary Spirulina on meat colour in muscle of broiler chickens. *British Poultry Science*, 42(2), 197-202. (<https://doi.org/10.1080/00071660120048447>)
- Trewavas, E. (1983). Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. *British Museum (Natural History)*. (<https://doi.org/10.5962/bhl.title.123198>)
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027. (<https://doi.org/10.1038/nature05414>)
- Ungsethaphand, T., Peerapornpisal, Y., Whangchai, N., & Sardsud, U. (2010). Effect of feeding Spirulina platensis on growth and carcass composition of hybrid red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*). *Maejo International Journal of Science and Technology*, 4(2), 331-336.

USDA Food Composition Databases 2017

- Valenzuela, A., Alveal, K., & Tarifeño, E. (2002). Respuestas hematológicas de truchas (*oncorhynchus mykiss walbaum 1792*) a estrés hipoxico agudo: serie roja. Gayana (Concepción), 66(2), 255-261. (<https://doi.org/10.4067/S0717-65382002000200024>)
- Van Kessel, M. A., Dutilh, B. E., Neveling, K., Kwint, M. P., Veltman, J. A., Flik, G., ... & den Camp, H. J. O. (2011). Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio L.*). AMB Express, 1(1), 41. (<https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-41>)
- Van Soest, P. V., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science, 74(10), 3583-3597. ([https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2))
- Vatsos, I. N., & Angelidis, P. (2010). Water quality and fish diseases. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 61(1), 40-48. (<https://doi.org/10.12681/jhvms.14875>)
- Velasquez, S. F., Chan, M. A., Abisado, R. G., Traifalgar, R. F. M., Tayamen, M. M., Maliwat, G. C. F., & Ragaza, J. A. (2016). Dietary Spirulina (*Arthrospira platensis*) replacement enhances performance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Applied Phycology, 28(2), 1023-1030. (<https://doi.org/10.1007/s10811-015-0661-y>)
- Venkataraman, L. V., Somasekaran, T., & Becker, E. W. (1994). Replacement value of blue-green alga (*Spirulina platensis*) for fishmeal and a vitamin-mineral premix for broiler chicks. British Poultry Science, 35(3), 373-381. (<https://doi.org/10.1080/00071669408417702>)
- Vijayan, M. M., Pereira, C., Grau, E. G., & Iwama, G. K. (1997). Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 116(1), 89-95. ([https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(96\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(96)00124-7))
- Villarroel, M., Tupac-Yupanqui, I., Nicodemus, N., Rico, M., Cañón, J., Menoyo, D., ...& Dunner, S. (2011). Expresión diferencial de genes en tilapia *Oreochromis niloticus* (L., 1758) bajo estrés alimentario. Boletín. Instituto Español de Oceanografía, 21(1-4), 261-270.
- Volpato, G. L., & Barreto, R. E. (2001). Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 34(8), 1041-1045. (<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000800011>)
- Vonshak, A., & Tomaselli, L. (2000). *Arthrospira* (Spirulina): systematics and ecophysiology. In The ecology of cyanobacteria (pp. 505-522). Springer, Dordrecht.
- Wang, Y. J., Chien, Y. H., & Pan, C. H. (2006). Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins, *Hyphessobrycon callistus*. Aquaculture, 261(2), 641-648.
- Ward, A. J., Webster, M. M., & Hart, P. J. (2006). Intraspecific food competition in fishes. Fish and Fisheries, 7(4), 231-261. (<https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2006.00224.x>)
- Watanuki, H., Ota, K., Tassakka, A. C. M. A., Kato, T., & Sakai, M. (2006). Immunostimulant effects of dietary Spirulina platensis on carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture, 258(1-4), 157-163. (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.003>)
- Wedemeyer, G. (1996). Physiology of fish in intensive culture systems. Springer Science & Business Media. (<https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6011-1>)

- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3), 591-625. (<https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>)
- Whitton, B. A. (1992). Diversity, ecology, and taxonomy of the cyanobacteria. In *Photosynthetic prokaryotes* (pp. 1-51). Springer, Boston, MA. (https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1332-9_1)
- Xarxa Spirulina (2016). Manual práctico de cultivo de espirulina en casa. red internacional de cultivadores de espirulina por la soberanía alimentaria. <http://www.xarxaespirulina.cat>
- Xie, J., Hu, L., Tang, J., Wu, X., Li, N., Yuan, Y., ...& Chen, X. (2011). Ecological mechanisms underlying the sustainability of the agricultural heritage rice–fish coculture system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), E1381-E1387. (<https://doi.org/10.1073/pnas.1111043108>)
- Ye, L., Amberg, J., Chapman, D., Gaikowski, M., & Liu, W. T. (2014). Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish. *The ISME Journal*, 8(3), 541. (<https://doi.org/10.1038/ismej.2013.181>)
- Yeganeh, S., Teimouri, M., & Amirkolaie, A. K. (2015). Dietary effects of *Spirulina platensis* on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Research in Veterinary Science*, 101, 84-88. (<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.06.002>)
- Zarrouk, C. (1966). Contribution a l'etude d'une Cyanophyce. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima*. Thesis. University of Paris, France.
- Zhai, Q., Yu, L., Li, T., Zhu, J., Zhang, C., Zhao, J., ...& Chen, W. (2017). Effect of dietary probiotic supplementation on intestinal microbiota and physiological conditions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under waterborne cadmium exposure. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(4), 501-513. (<https://doi.org/10.1007/s10482-016-0819-x>)
- Zhang, J., Miao, S., Huang, S., & Li, S. (2010). Effect different levels of *Spirulina* on ruminal internal environment and degradation of fibre in dairy cows. *China Cattle Science*, 36(6), 32-36.
- Zheng, J., Inoguchi, T., Sasaki, S., Maeda, Y., McCarty, M. F., Fujii, M., & Takayanagi, R. (2012). Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304(2), R110-R120. (<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00648.2011>)
- Zhou, Z. G., He, S., Liu, Y., Shi, P., Huang, G., & Yao, B. (2009). The Effects of Dietary Yeast Culture or Short-chain Fructo-oligosaccharides on the Intestinal Autochthonous Bacterial Communities in Juvenile Hybrid Tilapia, *Oreochromis niloticus*♀×*Oreochromis aureus*♂. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40(4), 450-459. (<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00272.x>)

ANEXO 1 PUBLICACIONES

Effect of spirulina (*Arthrospira platensis*) supplementation on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and stress responsiveness under hypoxia

Ignacio Plaza^{1,2}, José L. García² and Morris Villarroel¹

¹Universidad Politécnica de Madrid, ETSIAAB, Dept. de Producción Agraria, Avda. Puerta de Hierro 2, 28040 Madrid, Spain.

²CSIC, Centro de Investigaciones Biológicas, Biotecnología Medioambiental. C/ Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.

Abstract

Several recent studies have shown that *Arthrospira* sp. supplementation of feeds has a beneficial effect on fish health and growth, but less is known about its possible effects on stress responsiveness. The present study was designed to evaluate using *Arthrospira platensis* as a feed supplement for *Oreochromis niloticus* fry, reared in recirculating aquaculture systems (RAS). Two isocaloric and isonitrogenous (5.00/4.98 kcal/g DM and 44.6/44.8 CP% DM, respectively) fishmeal-based diets were prepared with 0% and 1% *A. platensis* and fed to fry (approximately 10 mg live weight, n=16 tanks with 25 fry each, feeding rate 6% live weight, four meals a day for 50 d). The weight gain per tank, specific growth rate and feed conversion ratio were similar among treatments, but *A. platensis* supplementation significantly increased survival ($p<0.05$). Stress responsiveness was measured in all fish from 12 tanks using a non-invasive two-choice test. All fish from one home tank (n=6 per treatment), were placed into a shaded tank where oxygen levels were slowly reduced. A doorway was then opened to a second illuminated tank with normal oxygen levels and the number of fish who left the home tank were counted. Significantly more of the fish fed *A. platensis* stayed in the home tank compared to controls, suggesting a lower stress responsiveness and a higher tolerance to hypoxia.

Key words: tilapia; feed additives, stress test; behaviour; non-invasive

Introduction

qua culture provides more than half of the world's fish (F O , 2016) but better feeding strategies are need in order to keep it sustainable. One option is to use natural feed additives instead of artificial antibiotics, which cannot be used as growth promoters in the European Union (Regulation 1831; European Commission, 2003) since they promote microbial resistance. *Arthrospira platensis* is a natural product that can improve the quality of the fish production by providing a rich source of vitamin B12 and β -carotene

(20 times more than carrots), essential amino acids, fatty acids ($\omega 3$ and $\omega 6$), and minerals (James *et al.*, 2006), protein (approximately 65% dry weight; Phang *et al.*, 2000), as well as anti-oxidant properties. For all of these reasons, it is commonly used as a natural supplement in animal feeds, including for fish (McCarty, 2007). Less is known about how *A. platensis* can improve the condition of weaker fish or their response to stress.

Several studies have considered the effects of *A. platensis* supplementation (less than 10% of diet) in fish. Red swordtail (*Xiphophorus helleri*) given % *A. platensis* increase feed consumption, body weight, length, gonad weight and number of offspring (James *et al.*, 2006). In three-spot gourami (*Trichopodus trichopterus*), Khanzadeh *et al.* (2016) found that 5 % *A. platensis* (replacing fishmeal) improves feed intake, feed conversion ratio (FCR) and the gonadosomatic index. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with 10 % *A. platensis* (a natural pigment source) deposit more carotenoids in muscle tissue (Teimouri *et al.*, 2013). Adding *A. platensis* to feed for guppies (*Poecilia reticulata*) improves their tolerance to a toxin (methyl red), manifested by a noticeable reduction in the cytotoxic effects on red blood cells (Sharma *et al.*, 2005). In *Oreochromis niloticus*, adding 0.5-1-2% *A. platensis* to feed improves its immune system (Abdel-Tawwab, 2009), has antioxidant effects and promotes growth (Takeuchi, 2002), but less is known about its possible effect on behaviour under stressful situations.

Regarding possible behavioural effects, *A. platensis* contains many different nutrients, including tryptophan and B6, which decrease psychological distress in humans (Shor-Posner, 1994). Fatty acids $\omega 3$, also present in *A. platensis*, can inhibit adrenal activation elicited by a mental stress in dogs (Delarue, 2003). Thus, supplementing *O. niloticus* diet with *A. platensis* could change their stress responsiveness. In their natural habitat, *O. niloticus* normally consumes algae (including cyanobacteria) and some invertebrates (Ibrahim *et al.*, 2013).

In the past decade, there have been many studies on fish welfare (Huntingford, 2005), and several methods have been proposed to measure stress, including non-invasive behavioural methods to measure stress coping styles using a two-choice test (Laursen *et al.*, 2011). Barreto *et al.* (2011) found that *O. niloticus* can be sorted into two opposing coping styles under stress, namely proactive (dominant) or reactive (passive). It is assumed that the development of a coping style depends on the genetic makeup of the fish and its previous experience (Sørensen *et al.*, 2013), but less is known about possible effects of nutrition. In this study we set out to verify whether a 1% *A. platensis* supplementation affected growth and survival as well as behavioural response to stress using the two-choice test.

2. Material and methods

Algae culture

We used the *A. platensis* strain PCC 9108 obtained from the Culture Collection at Spanish National Research Council (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC). *A. platensis* was grown in plastic bioreactors (120x12 cm) in a greenhouse at the Universidad Politécnica de Madrid (40.446353 N, -3.738341 E), from July to August using the natural photoperiod. The cultivation media was composed of four solutions (Table 1) modified from Zarrouk (1966). *A. platensis* was harvested when the culture reached approximately 1 g/L of dry weight. The harvest was performed from 9:30 to 10:30 am, when the protein content is higher (Jourdan 1999). Then the cells were dried on a horizontal sheet at 50°C for approximately 4-6 h and kept in an opaque container at 4°C to prevent oxidation before inclusion in the fish feed.

Fish and feeds

O. niloticus fry originally purchased from Valenciana de Acuicultura (Puçol, Valencia), were housed in 16 green fiberglass tanks (120 L, 0.46 m high, and 0.64 m in diameter). Each tank was connected to a filter (EHEIM Classic; MOD. 2217, 6 L of capacity, 20 W and water flow 1000 L/h) and aerated with an air pump common to all tanks. This set up allowed us to maintain independent water conditions in each tank so as not to mix sediments and bacteria among treatments. The filters were prepared by inoculating nitrifying bacteria (EHEIM water care), using the supplier indications. We added 5 ppm of ammonia daily for 3 weeks, testing the evolution of nitrogen compounds, until microbial activity was satisfactory. The distribution of treatments among the tanks was random.

O. niloticus fry were introduced in the tanks randomly and given a two-week acclimatization period. After that, all the fish from each tank were weighed in groups and their length measured individually using a ruler (day 0). The initial average weight per tank was a 2.64 ± 0.45 mg (mean $\pm$ SD; n= 25) and initial fish length was 1.17 ± 0.10 cm, with no significant differences among treatments. Fish were counted and weighed in groups at 30 d, and counted, weighed individually and measured at 50 d. To quantify mortality during the fry phase tanks were checked every day. The number of dead fish

were and eliminated. The incidence of mortality was not concentrated on any particular day nor in any particular tank.

To make the experimental diet, commercial feed (Skretting T3) was crushed and sifted to a crumb size of 0.5-1 mm, mixed with 1% of *A. platensis* by weight and passed through the same sieve. The control diet was made in the same way but with no added algae. The samples of food were sent, for their analysis, to the laboratories of the department of animal production of the ETSIAAB (Higher Technical School of Agronomic Engineering, Food and Biosystems). We worked with $n = 5$ per treatment, in each of the analyzes performed. The percentage of dry matter was obtained by oven drying at 105°C, up to constant weight, and the ash content by incineration 550°C. On the other hand, the protein content was carried out by the Kjeldahl (1883) method and the ethereal extract with previous hydrolysis. The fiber content was obtained by the Van Soest (1991) method and finally the energy was calculated by calorimetric bomb (Table 2). Both feeds were isocaloric (crude energy) and isoproteic (crude protein), 5.02/4.98 kcal/ g DM and 44.6/44.8 CP% DM, respectively, and were kept at 4°C until used. Fish were fed at 6% live weight using an auto-feeder (EHEIM 3581) that provided four meals a day (7:00 h, 12:00 h, 17:00 h and 22:00 h), beginning the trial on 04/08/2015 until 24/09/2015, for a total of 50 days (7 weeks). The filters were turned off for 20 min after each meal to avoid feed loss.

Water quality

Water quality measurements were taken in all tanks twice a week on Monday and Thursday after the first meal (9:30 to 10:00 h). The measurements included dissolved oxygen (DO₂), electrical conductivity (EC), and levels of ammonia, nitrites and nitrates (Hanna HI83203). Water quality parameters were maintained within normal values for *O. niloticus* growth (mean $\pm$ S.E.; temperature $27.3 \pm 0.25^\circ\text{C}$; pH 7.36 ± 0.33 ; EC 0.60 ± 0.07 dS; DO₂ 7.19 ± 0.17 ppm; NH₄ 0.01 ± 0.02 ppm; NO₂ 0.01 ± 0.02 ppm; NO₃ 13.48 ± 5.78 ppm), and were not significantly different between treatments.

Two-choice test

At the end of the trial (50 d), we performed a two-choice test based on Laursen *et al.* (2011), built using two circular tanks that were identical to the grow-out tanks (120 L) and attached to one another via a closable floodgate, 16 cm in diameter (Figure 1). Tank

A was tightly covered with black plastic (shaded) and Tank B was illuminated (natural light). Twelve two choice tests were carried out, using six tanks per treatment, discarding the tanks with less than 20 remaining fry (for *A. platensis* fry, where all tanks had over 20 fish, the six tanks were chosen randomly). For each test, all the fish in a tank were placed in Tank A at the same time and left to acclimate for 30 min. Then the door to the second tank (Tank B) was opened, and Tank A was bubbled with nitrogen gas to decrease oxygen levels (at a rate of 1 ppm per 10 min). Tank B was oxygenated to maintain normal oxygen levels (approx. 7 ppm) and a counter-current water flow was set up in each tank to avoid water flowing between tanks. Oxygen levels were monitored in both tanks every 5 min. Each test was recorded with a video camera to avoid the effects of any human disturbance. We noted the times when any fish left Tank A. The test ended when the first five fish had left Tank A or after one hour had passed.

Statistical analysis

All statistical tests were carried out using R.commander (R Core Team, 2013). According to a Shapiro/Wilk test, the data on water quality, growth and survival were normally distributed and were analyzed using a one-way ANOVA. The data from the two-choice tests did not follow a normal distribution and were analyzed using a Kruskal-Wallis test. The level of significance was $p < 0.05$ in both cases.

Results

Fish growth and survival

There were no significant growth differences among treatments at 30 or 50 d. Total body length was not significantly different among treatments (cm; mean $\pm$ SD; 4.13 ± 1.09 CTR, 4.22 ± 0.97 SPR) nor the coefficient of variation in total length (mean $\pm$ SD; 0.26 ± 0.08 CTR, 0.28 ± 0.08 SPR). However, there were significant differences regarding mortality ($p > 0.05$), which was lower in fry that received 1% of *A. platensis* (Table 3).

Two-choice test

The coping styles of the tilapia were significantly differences between treatments ($p > 0.05$). More *A. platensis* supplemented fry adopted a proactive coping style, taking a significantly longer time to leave Tank A, despite decreasing oxygen levels (Figure 1).

Control fish tended to leave Tank A in groups of two or more fish, while *A. platensis* fry tended to leave one by one ($p>0.05$; see Table 4). Also, focusing on fish size, fry that left Tank A tended to be smaller, less than 3 cm long ($p=0.148$), in both treatments.

Discussion

The main goal of fish nutrition is to provide a balanced mixture of ingredients to support vital functions at an acceptable cost. Following this line of thought, at the moment it would not be cost-effective to use *A. platensis* (≈ 40 €/kg) as a protein substitute, but it may be useful as a nutritional supplement, since it improves feed efficiency, carcass quality, and physiological response to stress in several species of fish (Takechi *et al.*, 2002, Abdel-Tawwab *et al.*, 2009, Velasquez *et al.*, 2016). In the current study, adding 1% *A. platensis* to feed did not affect production indices (FCR, growth) compared to controls. This contradicts previous studies such as James *et al.* (2006), using *Xiphophorus helleri* (8% supplementation) and Abdel-Tawwab and Ahmed (2009) (0.5% to 1% supplementation) who observed improved growth. However, Tukeuchi (2002) found that the specific growth rate and feed efficiency of *Arthrospira* sp.-fed *Oreochromis* sp. were lower than controls. Our findings of a 9% higher survival rate are in accordance with other studies that report 6% higher survival at 1% *Arthrospira* sp. supplementation after a bacterial challenge (Ibrahim *et al.*, 2013). However, Abdel-Tawwab and Ahmed (2009), and Ungsethaphand *et al.* (2010) did not observe differences in survival among fish fed with *Arthrospira* sp. compared to controls. Our study may be different, however, due to the size of the fish. When the trial began, tilapia were in the fry stage (around 2–3 cm body length), when their diet changes begins to change from more omnivorous to carnivorous. It then changes back again to phytoplanktivorous filter feeding at about 6–7 cm (Ibrahim *et al.*, 2013). The change to carnivorous could increase hierarchical stress and cannibalism, reducing the survival of weaker fry (Berrios & Snow, 1983). In this scenario, the high vitamin content of *A. platensis* could have played a role, helping to promote growth and decrease mortality.

Two-choice test

Regarding the two-choice test, our results suggest that more of the fry consuming *A. platensis* supplemented feed adopted a proactive coping style, since more of them remained in a stressful environment despite the possibility of escape. As suggested by Barreto *et al.* (2011) the fish that remain in the "stressful" tank have a lower reaction to

stress and can be classified as proactive. Although several recent studies have assessed coping styles in fish (e.g., Ferrari *et al.*, 2016), few have considered the effects of nutritional supplementation. Some authors have shown that *A. platensis* affects plasma cortisol and glucose levels. In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cortisol and glucose significantly decreased with increasing of inclusion *A. platensis* at 0 to 10% (Yeganeh *et al.*, 2015). In great sturgeon (*Huso huso*), Adel *et al.* (2016) found that blood glucose increased at higher inclusion of *A. platensis* (10%). Furthermore, according to Delarue (2003), adding $\omega 3$ fatty acids to fish diets can inhibit adrenal activation elicited by psychological stress. *Arthrospira* sp. has a high level of unsaturated long chain fatty acids such as $\omega 3$ and $\omega 6$, which may have provided a similar effect in *O. niloticus*. In this sense, Anzola (2013) found a decrease in psychological stress with higher tryptophan intake in dogs, and Shor-Posner (1994) found the same effect in humans with tryptophan and vitamin B6 supplementation. *A. platensis* contains tryptophan (1.5% DM) and vitamin B6 (0.8%DM). Taking into account that the tryptophan requirement of *O. niloticus* is 1% of the diet; with the inclusion of 1% *A. platensis*, it is increased to 1.15%. The vitamin B6 requirements in juvenile *Oreochromis* sp. are 15 to 16 ppm of the diet (Shiau & Hsieh, 1997), but that was increased to 80 ppm (500% more than estimated control levels) by adding 1% of *A. platensis*.

In fish, body length is a strong predictor of individual positions in a hierarchy (Ward *et al.*, 2006). Large fish are presumably more proactive, dominating other individuals, taking prime feeding sites and aggressively excluding smaller subordinate competitors (Webster and Hixon 2000). In addition, the fish, which feel threatened, seek the safety of the group, as was the case with the control fish. Our results agree with that hypothesis since it was the smaller fish that tended to leave Tank A while larger fish did not. Finally, although it was not our aim to measure resistance to hypoxia, our results also suggest that the *A. platensis* fish were more tolerant to low oxygen levels. This is in accordance with other studies in humans, where *Arthrospira* sp. supplementation increases cardiovascular capacity (Kalafati *et al.*, 2010). Moreover, it has been found to increase hematocrit levels of *O. niloticus* (Ibrahim *et al.*, 2013), which improves the efficiency of oxygen consumption. This finding is important for the aquaculture industry since oxygen levels are often a limiting factor for production (Abdel-Tawwab *et al.*, 2015).

Conclusions

Supplementing *O. niloticus* fry with *A. platensis* strain PCC 9108 increased survival and the proportion of individuals that adopted a proactive coping style, based on the results from a two-choice test. The results also suggest that *A. platensis* increased resistance to hypoxia, which is important for intensive aquaculture production.

Acknowledgments

This work was performed within the project INSPIRA1 (Ref. S2013/ABI2783) funded by the Community of Madrid and co-financed by structural funds of the European Union FEDER

Bibliography

- Abdel-Tawwab M, Ahmad MH, 2009. Spirulina (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Aquac Res* 40 (9): 1037-1046.
- Abdel-Tawwab M, Hagra AE, Elbaghdady HAM, Monier MN, 2015. Effects of dissolved oxygen and fish size on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): growth performance, whole-body composition, and innate immunity. *Aquacult Int* 23 (5): 1261-1274.
- Anzola B, 2013. The use of tryptophan in shelter dogs to treat stress-related anxiety disorders. *Rev Cient* 23 (1): 26-32.
- Barreto RE, Volpato GL, 2011. Ventilation rates indicate stress-coping styles in Nile tilapia. *J Bioscience* 36 (5): 851-855.
- Berrios-Hernandez JM, Snow JR, 1983. Comparison of methods for reducing fry losses to cannibalism in tilapia production. *Prog Fish Cult*, 45 (2): 116-118.
- Delarue JOCP, Matzinger O, Binnert C, Schneiter P, Chiolo R, Tappy L, 2003. Fish oil prevents the adrenal activation elicited by mental stress in healthy men. *Diabetes and Metab* 29 (3): 289-295.
- EC, 2003. Regulation N° 1831/2003 of the European Parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrient. *Office Journal of the European Union*, 43. [Lex - 32003R183]
- FAO, 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.
- Ferrari S, Horri K, Allal F, Vergnet A, Benhaim D, Vandeputte M, Chatain, B, Bégout ML, 2016. Heritability of boldness and hypoxia avoidance in European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Plos One* 11 (12): e0168506.
- Huntingford FA, Adams C, Braithwaite VA, Kadri S, Pottinger TG, Sandøe P, Turnbull JF, 2006. Current issues in fish welfare. *J Fish Biol* 68 (2): 332-372.
- Ibrahim MD, Mohamed MF, Ibrahim MA, 2013. The role of spirulina platensis (*Arthrospira platensis*) in growth and immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its resistance to bacterial infection. *J Agr Sci* 5 (6): 109-117.
- James R, Sampath K, Thangarathinam R, Vasudevan I, 2006. Effect of dietary spirulina level on growth, fertility, coloration and leucocyte count in red swordtail, *Xiphophorus helleri*. *The Israel J Aquaculture* 58: 97-104.

- Jourdan JP, 1999. Cultivez votre spiruline, manuel de culture artisanale de la spiruline. Antenna Technology. Paris, Francia.
- Kalafati M, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Paschalis V, Theodorou AA, Sakellariou GK, Kouretas D, 2010. Ergogenic and antioxidant effects of spirulina supplementation in humans. *Med Sci Sports Exerc* 42 (1) 142-151.
- Khanzadeh M, Fereidouni AE, Berenjestanaki SS, 2016. Effects of partial replacement of fish meal with spirulina platensis meal in practical diets on growth, survival, body composition, and reproductive performance of three-spot gourami (*Trichopodus trichopterus*) (Pallas, 1770). *Aquacult Int* 24 (1), 69-84.
- Kjeldahl J, 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Z. Anal Chem* 22(1), 366-382.
- Laursen DC, Olsén HL, de Lourdes Ruiz-Gomez M, Winberg S, Höglund E, 2011. Behavioural responses to hypoxia provide a non-invasive method for distinguishing between stress coping styles in fish. *Appl Anim Behav Sci* 132 (2): 211-216.
- McCarty MF, 2007. Clinical potential of spirulina as a source of phycocyanobilin. *J Med Food* 10 (4): 566-570.
- Phang SM, Miah MS, Yeoh BG, Hashim MA, 2000. Spirulina cultivation in digested sago starch factory wastewater. *J Appl Phycol* 12 (3): 395-400.
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available at www.r-project.org. [21 September 2013].
- Sharma S, Sharma S, Sharma KP, 2005. Protective role of spirulina feed in a freshwater fish (*Poecilia reticulata* Peters) exposed to an azo dye-methyl red. *Indian J Expl Biol* 43: 1165-1169.
- Shiau SY, Hsieh HL, 1997. Vitamin B6 requirements of tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* fed two dietary protein concentrations. *Fish Sci* 63 (6): 1002-1007.
- Shor-Posner G, Feaster D, Blaney NT, Rocca H, Mantero-Atienza E, Szapocznik J, Baum MK, 1994. Impact of vitamin B6 status on psychological distress in a longitudinal study of HIV-1 infection. *Int J Psychiat Med* 24 (3): 209-222.
- Sørensen C, Johansen IB, Øverli Ø, 2013. Neural plasticity and stress coping in teleost fishes. *Gen Comp Endocr* 181: 25-34.
- Takeuchi T, Lu J, Yoshizaki G, Satoh S, 2002. Effect on the growth and body composition of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed raw spirulina. *Fisheries Sci* 68 (1): 34-40.
- Teimouri M, Amirkolaie AK, Yeganeh S, 2013. The effects of spirulina platensis meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 396: 14-19.
- Ungsethaphand T, Peerapornpisal Y, Whangchai N, Sardud U, 2010. Effect of feeding spirulina platensis on growth and carcass composition of hybrid red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*). *Maejo Int J Sci Technol* 4 (2): 331-336.
- Van Soest PV, Robertson JB, Lewis BA. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Anim Sci* 74(10), 3583-3597.
- Velasquez SF, Chan MA, Abisado RG, Traifalgar RFM, Tayamen MM, Maliwat GCF, Ragaza JA, 2016. Dietary spirulina (*Arthrospira platensis*) replacement enhances performance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Appl Phycol* 28 (2): 1023-1030.
- Ward AJ, Webster MM, Hart PJ, 2006. Intraspecific food competition in fishes. *Fish Fish* 7 (4): 231-261.
- Webster MS, Hixon MA, 2000. Mechanisms and individual consequences of intraspecific competition in a coral-reef fish. *Mar Ecol Prog Ser* 196: 187-194.

Yeganeh S, Teimouri M, Amirkolaie AK, 2015. Dietary effects of *Spirulina platensis* on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Res Vet Sci 101: 84-88.

TABLES

Table 1. *Arthrospira* sp. culture medium composition. Culture medium consists of four different solutions. The first solution is the Macroelements, which will form the base solution, to which added the other three. Solutions A and B adds at the rate of 1 mL/L, and the trace solution to 100 mL/L.

Macroelements	Base g/L
NaHCO ₃	16.50 g/L
NaCl	1.00 g/L
K ₂ HPO ₄	0.55 g/L
NaNO ₃	2.50 g/L
K ₂ SO ₄	1.00 g/L
Solution A	1 ml/L
H ₃ BO ₃	0.2 g/L
MnCl ₂ 4·H ₂ O	1.1 g/L
CuSO ₄ 5·H ₂ O	0.0 g/L
ZnSO ₄ 7·H ₂ O	0.22 g/L
MoO ₃	0.02 g/L
Solution B	1 ml/L
CoN ₂ O ₆ 6·H ₂ O	0.44 g/L
NiSO ₄ 7·H ₂ O	0.4 g/L
TiSO ₄	0.20 g/L
Trace Solution	100 ml/L
C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O FeNa 3·H ₂ O	0.0 g/L
CaCl ₂	0.04 g/L
MgSO ₄ 7·H ₂ O	2.00 g/L
FeSO ₄ 7·H ₂ O	0.01 g/L

Table 2. Proximate composition of experimental diets (DM dry matter, ash, CP crude protein; EE ether extract, NDF neutral detergent fiber, DF acid detergent fiber, DL acid detergent lignin and CE crude energy).

	Control	<i>A. platensis</i>
DM (%)	92.60	92.60
sh (%)	7.39	7.37
CP (%/DM)	44.59	44.3
EE (%/DM)	6.39	6.44
NDF (%/DM)	26.4	26.23
DF (%/DM)	4.9	5.05
DL (%/DM)	0.6	0.7
CE (Kcal /gr MS)	5.00	4.9

Table 3: Mean ($\pm$ S.E.) initial bulk weight (IBW), weight bulk gain (WBG grams), feed conversion ratio (FCR) and % survival (% Srv) of *Oreochromis niloticus* control and fed *Arthrospira platensis*.

TRT	Control (n)	<i>A. platensis</i> (n)	p-Value
IBW (d0)	2.42 $\pm$ 0.53 ^a	2.6 $\pm$ 0.76 ^a	0.20
WBG (d30)	26.21 $\pm$ 2.57 ^a	26.07 $\pm$ 2.61 ^a	0.2
WBG (d50)	66.93 $\pm$ 7.15 ^a	70.55 $\pm$.33 ^a	0.32
FCR (d30)	0.73 $\pm$ 0.07 ^a	0.74 $\pm$ 0.09 ^a	0.9
FCR (d50)	0.3 $\pm$ 0.10 ^a	0.79 $\pm$ 0.07 ^a	0.40
% Srv (d30)	4.5 $\pm$ 7.23 ^a	93.5 $\pm$.0 ^b	0.04
% Srv (d50)	4.0 $\pm$ 6.76 ^a	93.0 $\pm$.50 ^b	0.03
% Srv (d30-50)	99.5 $\pm$ 1.54 ^a	99.5 $\pm$ 1.41 ^a	0.9

Values followed by the same superscript letters in the same row are not significantly different ($P > 0.05$).

Table 4: Time output means of the first five fish, during hypoxic challenge in minutes, and % of fish leave the Tank A on group or alone.

TRT	Mean output time	Mean output O ₂ level	Group Leavers (%)	Individual Leavers (%)
Control (n6)	17.35 ^a min	4.01 ^a ppm	7 ^a	13 ^a
<i>A. platensis</i> (n6)	30.20 ^b min	2.3 ^b ppm	40 ^b	60 ^b
p-value	0.001	0.001	0.021	0.021

Values followed by the same superscript letters in the same row are not significantly different ($P > 0.05$).

FIGURES

Fig 1. Two-choice scheme. Two tanks attached via a floodgate (closable door). Tank A was in darkness and water was infused with nitrogen to decrease oxygen levels. Tank B was under natural light and had normal oxygen levels. Water was rotated in both tanks in the same direction to avoid water moving from one tank to another, through the floodgate.

Fig 2. Departure times of the first five fish per treatment. Differentiating between controls (O), and *A. platensis* (▲). The continuous line is the O₂ concentration in ppm in Tank A (TA), and the regression curve (---) to know at what level O₂ of the fish responded, $(1.78+6.19 \times 0.94^{\min})$ ($r=0.98$).

Effect of *Arthrospira* supplementation on *Oreochromis niloticus* gut microbiota and flesh quality

Ignacio Plaza^{1,2} | José Luis García² | Beatriz Galán² | Jesús de la Fuente³ | Rubén Bermejo-Poza³ |
Morris Villarroel¹

¹Departamento de Producción Agraria, ETSIAAB, Universidad Politécnica de Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain.

²Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Calle Ramiro de Maeztu, 9, 28040, Madrid, Spain.

³Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain.

Correspondence

Ignacio Plaza, Departamento de Producción Agraria, ETSIAAB, Universidad Politécnica de Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain. Email: i.plazagordo@gmail.com

Abstract

Supplementing fish feed with *Arthrospira platensis* has several beneficial effects, such as improved growth, survival and feed conversion, but little is known about how it affects gut microbiota or flesh quality. In this trial, feed with 3% *A. platensis* was given to *Oreochromis niloticus* (SPR, spirulina supplemented) over a period of 50 days and their gut microbiota and flesh quality were compared with controls (CTR, no supplementation). Average daily growth was higher in SPR fish ($P < 0.05$). Regarding microbiota, a total of 5,470,272 readings (individuals) were obtained from 16 gut samples ($n = 8$ CTR, $n = 8$ SPR), with a gamma diversity of 1,563 species. Although, no significant differences were found between treatments, two gut microbiota ecotypes were observed, comparing the results of this study with those of the literature. Main one dominated by Proteobacteria (36.6%) and Fusobacteria (32.9%), and secondary one dominated by Actinobacteria (37%). Regarding flesh quality, significant differences were observed in flesh colour post mortem (a^* , b^* and chroma). These changes corresponded with higher reflectance in the range of 470-500 nm and 620-670 nm in SPR tilapia, which corresponds with the reflectance range of β -carotene and phycocyanin. However, *rigor mortis* was resolved earlier in SPR fish ($P < 0.05$).

KEYWORDS

Arthrospira platensis, *Oreochromis niloticus*, gut microbiota, flesh quality

1 | INTRODUCTION

In an effort to reduce the use of antibiotics in intensive animal production, researchers have been looking for alternatives (El-Haroun *et al.*, 2006; He *et al.*, 2017; Fečkaninová *et al.*, 2017), including prebiotics (Mosenthin & Bauer, 2000; Patterson & Burkholder, 2003; Gaggia *et al.*, 2010), which stimulate the activity of beneficial microbiota in the intestine while improving health and growth. Prebiotics are more commonly used in terrestrial animals than in fish and shellfish, but a number of studies have shown the beneficial effects of using prebiotics in aquaculture (Ringø *et al.*, 2010, Ringø *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). The prebiotics used in fish include short chain fatty acids (Manzano *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014), non-digestible oligosaccharides (fructose, galactose, xylose and glucose; Zhou *et al.*, 2007; Ly *et al.*, 2007; Grisdale-Helland *et al.*, 2008, Zhou *et al.*, 2009; Ringø *et al.*, 2016), and dietary fibre (inulin, oligofructose or cellulose; Cerezuela *et al.*, 2008; Ringø *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2003; Ringø *et al.*, 2016). All of these compounds can be found in microalgae and cyanobacteria (O'Sullivan *et al.*, 2010; Evans & Critchley, 2014; De Jesus Raposo *et al.*, 2016; Leal *et al.*, 2017; Lyons *et al.*, 2017), which has increased interest in their use as dietary supplements.

One cyanobacteria used as a natural nutritional supplement is *Arthrospira sp.*, which promotes health and growth in fish (McCarty, 2007) and has been shown to have prebiotic effects *in vitro* (Parada *et al.*, 1998). In *Oreochromis niloticus*, *Arthrospira sp.* supplementation improves the immune system (Abdel & Ahmad, 2009) and growth (Belal *et al.*, 2012), probably due to its high content in xylose, fructose, galacturonic and glucuronic acids (all of which are considered prebiotics) and other compounds such as $\omega 3$ and $\omega 6$ fatty acids, β -carotene or phycocyanin (Pingnolet *et al.*, 2012), which have antiviral activity (Chamorro *et al.*, 2002). Different strategies have been used to modify intestinal microbiota using prebiotics in *Oreochromis sp.* (Haygood & Jha, 2016), but the effect of *Arthrospira sp.* on microbiota and flesh quality is not well understood.

Gut microbiota affects growth, immune function and gut barrier actions (Backhed *et al.*, 2004; Turnbaugh *et al.*, 2006 O'Hara & Shanahan, 2006). In fish, several metagenomic-based studies have found that different treatments affect gut microbiota, but the results are quite variable. Recently, Lyon *et al.* (2016) found that *Oncorhynchus mykiss* supplemented with 5% microalgae had more diverse gut microbiota than controls. In *Oreochromis sp.*, Koh *et al.* (2014) found that fish fed with organic acids had significantly lower colony forming units of adherent gut bacteria compared to the control or oxytetracycline feed. Pedrotti *et al.* (2015) studied the effect of dietary

carbohydrate on microbiota in *O. niloticus* and showed that cassava bagasse and ground corn increase significantly ($P < 0.05$) the population of amylolytic bacteria in tilapia.

Improvements in technology used to characterize microbiota, such as the Illumina technique, have facilitated the study of gut microbiota in general. Table 1 summarizes the techniques and primers used by different authors to identify gut microbiota in different fish species. Gajardo *et al.* (2016) built a high-resolution map of the gut microbiota in *Salmo salar* (Atlantic salmon) using Fluorometria Qubit 2.0. Dehler *et al.* (2017) studied environmental and physiological factors in *S. salar* parr gut microbiota. In *O. niloticus* Giatsis *et al.* (2015), using 454 pyrosequencing, studied the impact of rearing environment on the development of gut microbiota, but less has been analysed regarding the effect of *A. platensis* on *O. niloticus* gut microbiota.

Besides its effect on microbiota, microalgae and their pigments have been used extensively in aquaculture as colouring agents in feeds for *O. mykiss* and *S. salar* to modify flesh colour (Sommer *et al.*, 1991, 1992; Baker *et al.*, 2002). Since concerns have been raised about the safety of certain artificial pigments (Penninks *et al.*, 2017), algae can be a viable natural alternative for several species. Microalgae and their components can also help to improve the biochemical composition of fish flesh. In *Oreochromis* sp., several studies have analysed how supplementing with *Arthrospira* sp. (less than 10% of diet) can change flesh texture, protein and fatty acid composition (Lu *et al.*, 2003; James *et al.*, 2006; Ungsethaphand *et al.*, 2010; El-Sheekh *et al.*, 2014; Khanzadeh *et al.*, 2016). In *O. niloticus*, adding 0.5-1-2% *A. platensis* to feed improves its immune system (Abdel-Tawwab & El-Hamad, 2009), has antioxidant effects and promotes growth (Takeuchi *et al.*, 2002). However, less is known about the effect of this cyanobacterium on the evolution of *rigor mortis* and flesh pigmentation over time. In this study we analysed how *A. platensis* affected intestinal microbiota and flesh quality in *O. niloticus* grown in raceways.

2| MATERIALS AND METHODS

2.1 | Fish and installations

The trial was carried out at the aquaculture facilities of the College of Forestry Engineering, Technical University of Madrid (Madrid, Spain; 40.4508 N, -3.7210 W). The fish farm is located on a slope divided into terraces with raceways. The terrace arrangement allows the downward water flow to be distributed among the different raceways by means of channels and water falls. For the trial we used one raceway (total volume 5.16 m³), filled with water from an underground well and recirculated. *O. niloticus* fry, originally purchased from Valenciana de Acuicultura (Puçol, Spain), were

placed into one raceway until they reached 90.2 ± 2.6 g (mean $\pm$ SD). After that fish were anesthetized, weighed and tagged individually by placing a PIT-tag (i-Tag 162,2x12 mm) under the dorsal fin. Then fish were placed into one of four divisions in the same raceway (1.5 x 0.8 x 0.4 m; length x width x height), with n=25 fish per division, and were left to acclimate for 22 days, during which they were fed commercial feed (T3 Skretting, Stavanger, Norway) at 2% live weight.

The experimental feed was made by grounding up the commercial control feed (T3 Skretting) and adding 10 g of *A. platensis* strain PCC 910 (SPR) per kg of feed. Both control (CTR) and experimental (SPR) diets were isocaloric and isoproteic (see Table 2), 5.02/4.9 kcal·g⁻¹ dry matter (DM), and 44.6/44. PB % DM respectively, and were kept at 4°C until used. Fish were fed at 3,5% live weight during the trial (0 to 50d). To adjust the feed to the growth of the fish, it was started with 5 g of feed per tank. Every two weeks, it was increasing by 5 g, until reaching 105 g in the last week.

2.2 | Algae Culture

We used the *A. platensis* strain PCC 910 obtained from the Culture Collection at the Spanish National Research Council (*Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, CSIC. Madrid, Spain). *A. platensis* was grown in plastic bioreactors (120 x 12 cm) in a greenhouse at the Universidad Politécnica de Madrid, Spain (40.446353 N -3.73 341 E) from July to August (2016), using Zarrouk medium (Zarrouk, 1966) composed of four solutions. SPR was harvested when the culture reached approximately 1 g·l⁻¹ of dry weight. The harvest was performed from 9:30 to 10:30 am when the protein content is higher (Jourdan, 1999). Then cells were dried on a horizontal sheet at 50°C for approximately 4-6 h and kept in an opaque container at 4°C to prevent oxidation before inclusion in the fish feed.

2.3 | Water quality

Water quality measurements were taken in each compartment twice a week (on Monday and Thursday) after the first meal (between 9:30 - 10:00 h). The measurements included dissolved oxygen (DO₂), electrical conductivity (EC), and levels of ammonia, nitrites and nitrates (Hanna HI 3203, Hanna Instruments, Woonsocket, US). The water temperature was recorded once every 5 min throughout the trial using an underwater temperature sensor (Hobo-U11, ONSET, Bourne, Massachusetts, US). All water quality parameters were within normal ranges (Zaza *et al.*, 200; Ebeling *et al.*, 2012; Boyd & Tucker, 2012) for tilapia (mean $\pm$ SD, temperature 27.3 ± 0.3 °C; pH 7.3 ± 0.15 ; EC 0.50 ± 0.01 dSm; O₂ 7.12 ± 0.05 ppm; NH₄ 0.43 ± 0.29 ppm) and were not significantly different between treatments.

2.4 | Sampling

Fish were weighed and measured individually at the beginning of the adaptation period (-22 d) and when the trial began (0 d). We noted the amount of feed provided to each compartment throughout the trial. At the end of the trial (day 50) with 24 h of fasting, fish were caught and euthanized with an overdose of eugenol (100 mg/L), and then weighed and measured individually. 40 SPR fish and 40 CTR fish (20 per division) were blood sampled to evaluate hematological variables. Blood samples were taken from the caudal vein using 2 ml syringes, 1 ml was centrifuged at $6000 \times g$ for 10 min and the plasma was extracted to measure cortisol glucose and lactate (using sodium fluoride as the anticoagulant). Another 1 ml of blood was used to measure creatine phosphokinase (CPK), triglycerides, leucocytes and hematocrit (with ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, as anticoagulant) and immediately stored at 4 °C until analysis.

After blood sampling, half of the fish (n=20) were used to measure flesh pH and colour and the other half to measure *rigor mortis*. Flesh pH was measured at 0, 6 and 24 h in the same front-dorsal region using a pH-meter with temperature compensation (HI-9025, Hanna Instruments, Woonsocket, USA). Flesh colour was measured on 20 fish per treatment on the upper front-dorsal region at 0 and 24 h *post-mortem*, using a Minolta Spectrophotometer CM-2500c (Minolta, Osaka, Japan). For its determination, the CIE L * a * b * colour space was used (Commission Internationale de l'Eclairage, CIE, 2004). This system allows to identify a colour with the coordinates L* (luminosity), a* (index of red) and b* (index of yellow). With a* and b* indices, parameters C* (chroma) and h* (hue) were calculated.

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$h^*(^\circ) = \arctan(b^*/a^*)$$

Rigor mortis was measured at 0, 6, 24 and 48 h *post-mortem* using Cuttlinger's method (Korhonen *et al.*, 1990). We also calculated average daily gain in percentage (ADG) and division feed conversion ratio (T.FCR) as:

$$ADG (\%) = \frac{\text{final weight (g)} - \text{initial weight (g)}}{\text{day}} \times 100$$

$$D.FCR = \frac{\text{feed supplied (g)}}{\text{final weight (g)} - \text{initial weight (g)}}$$

2.5 | Isolation of DNA

Among the fish used to measure flesh pH, samples of intestinal microbiota were taken from four fish per division, eight per treatment. The microbiota samples were taken 1.0 cm from the distal part of the intestine in order to avoid the heterogeneity reported by taking samples from different areas of the intestine (Suzuki & Nachman, 2016). They were then stored in 2 ml tubes labelled with the chip number and processed fresh and maintained at 4°C on ice during the process. Duplicate samples were processed immediately using the QIAamp Stool minikit (Qiagen, Crawley, United Kingdom) according to the manufacturer's instructions for large volume samples (using 10 ml buffer ASL instead of 2ml).

2.6 | PCR and MiSeq

According to Chakravorty *et al.* (2007), V2 and V3 are the most adequate regions to distinguish among bacterial species at the genus level, except for the closely related Enterobacteriaceae. V2 is best to distinguish between mycobacterial species and V3 among *Haemophilus* species. Other authors working with tilapia have also used the V1-V2 region, such as Fan *et al.* (2003), Giatsis *et al.* (2015) and Gajardo *et al.* (2017), so we thought it best to use the same regions in order to facilitate comparisons. Barcoded amplicons from the V1-V2 (~310 pb) region of 16S rRNA genes were generated by PCR using the 27F-DegS primer (GAG TTT GAT CMT GGC TCA G), as a reverse primer, and equimolar mix of two primers 338RI (GCW GCC TCC CGT AGG AGT) and 388RII (GCW GCC ACC CGT AGG TGT). The PCR protocol used 100 ng of total DNA, 0.5 U of Taq DNA polymerase, 2.5 mM DMSO buffer, 5 µl dNTPs, 10 µl Oligo 27F, 5 µl Oligo 338RI, 5 µl Oligo 388RI, in 50 µl final volume. The PCR cycle was 1 min at 95 °C, 45 s at 57 °C, and 45 s at 72 °C in an Eppendorf thermocycler, followed by 30 cycles of 45 s at 95 °C, 30 s at 56 °C, and 30 s at 72 °C, to close the cycle at 4 °C. Finally, the samples were shipped to Macrogen Inc.© (Republic of Korea) to perform its sequencing. The MiSeq system Illumina SBS technology uses a proprietary reversible terminator-based method that detects single bases as they are incorporated into DNA template strands. As all 4 reversible, terminator-bound dNTPs are present during each sequencing cycle, natural competition minimizes incorporation bias and greatly reduces raw error rates compared to other technologies.

The data from sequencing were analysed using Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME). Population diversity indices were calculated using the Shannon, Simpson, Margalef and Chaos methods using the PAST program (Hammer *et al.*, 2000) where:

Shannon's index: $H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2(p_i)$ (Magurran, 2013).

Simpson's index diversity: $1 - D$; $D = \sum_{i=1}^n n_i(n_i - 1)/N(N - 1)$ (Magurran, 2013).

Margalef's Richness index : $d = (S - 1)/\ln N$ (Gamito, 2010).

Chaos 1 coefficiente = $S + a^2/2b$ (Chao, 1984; Smith & van Belle, 1984 & Chao & Lee, 1992)

S; Number of species in the sample.

p_i ; Proportion of individuals of species i in the total sample = n_i/N .

n_i ; Number of individuals of species i .

N ; Total number of individuals.

b ; Species that are represented by a single individual in the sample ("singletons").

a ; Number of species represented by a pair of individuals in the simple ("doubletons").

2.7 | Statistical analysis

All statistical tests were carried out using R.software (R Core Team, 2015). The data following a normal distribution were analysed with a one-way ANOVA and Turkey's multiple-comparison test. The level of significance for all analyses was set at $P < 0.05$. For the taxonomic analysis the QIIME program was used (97%). Similarity studies of samples were performed with the PAST program (Hammer *et al*; 2000), Bray-Curtis test (PAST software, 2017).

3 | RESULTS

3.1 | Growth and survival

During the experiment there were no mortality. No differences were found in growth parameters during the adaptation phase (-22 to 0 day). However, during the trial phase (0 to 50 days), individual weight and length, average daily gain and race-way division

weight were higher in SPR fish (Table 3). Supplementation with 3% *A. platensis* increased growth by 10% compared with controls and better FCR.

3.2 | Blood analysis

There were no significant differences in glucose, lactate and CPK levels, nor in haematocrit or leucocyte count. However, SRP-fish had significantly higher values of triglycerides (TGC) and cortisol (Table 4). Levels of TGC in SPR-fish were almost double the levels in control fish.

3.3 | Flesh quality

During the first hours after slaughter (0h and 6h), no differences were found between treatments regarding flesh pH or *rigor mortis*. However, *rigor mortis* angle was significantly lower in CTR-fish at 4 h *post-mortem* (Table 5). No significant differences ($P < 0.05$) were found between treatments at 0h but L^* was somewhat higher in SPR fish. After 24h, the flesh colour was reversed, with significant differences in both parameters a^* and b^* with higher levels in SPR fish, while C^* value was higher for CTR. No significant differences were found in L^* parameter between treatments.

Differences in reflectance were found at different wavelengths after 24h *post-mortem*, when SPR fish presented a greater reflectance of light in the ranges of 470nm-500nm and 620nm-670nm (Figure 4 and Table 6).

3.4 | Intestinal microbiota

We obtained 5,470,272 readings, corresponding to 1,563 species from the 16 gut samples. No significant differences were found between treatments regarding the measures of microbial diversity (Shannon, Simpson, Margalef and Chao-1). Confidence level coverage was at the 97% similarity level (Table 7).

On average, the composition of gut microbiota at the phylum level was composed of 36.6% Proteobacteria, 32. % Fusobacteria, and 9.24% actinobacteria (Figure 1), although, these percentages varied considerably among individuals. Three of the control samples presented high levels of actinobacteria, and two of the SPR samples had high values of actinobacteria (37%). On the other hand, while genera such as *Spirochaetae*, *Euryarchaeota* or *Hydrogenedentes* only appeared in SPR fish, they represented less than 0.05% of the population.

At the genus level, we find a similar situation (Figure 2), where the top 15 represented more than 75% of the genera found. The most representative genus was *Cetobacterium* (32. %), followed by *Aeromonas* (13.9%), *Escherichia/Shigella* (6.7%) and *Propionibacterium* (5.2%). However, we found some divergence in samples, with higher patterns in actinobacteria. *Propionibacterium* (above 30%) in two individuals (CTR-056 and SPR-3F) and around 10% in two controls

(CTR-FF9 and CTR-FF9B), where the predominant *proteobacteria* was *Escherichia/Shigella* (above 45%). Finally, *Mycobacterium* was the dominant *actinobacteria* in SPR-3331, at 37. %.

The alpha-diversity study (Table 6) showed that there were no significant differences between treatments. cluster was also performed (Figure 3) to analyse β diversity, but there were no significant differences in bacterial diversity among treatments.

4 | DISCUSSION

Supplementation with *A. platensis* improved growth rates and FCR in SPR tilapia, as found in other species of fish, such as Adel *et al.* (2016) in *Huso huso* (10% supplementation), James *et al.* (2006) in *Xiphophorus helleri* (8%) and Abdel-Tawwab *et al.* (2009) in *O. niloticus* (5%). However, Tukeuchi (2002) reported the opposite, a lower specific growth rate and poorer feed efficiency in *Oreochromis sp.* fed *Arthrospira sp.* Overall, our results support the idea that *Arthrospira sp.* helps promote animal growth, as noted in other vertebrates as well (e.g., broilers grow more with 1% *Arthrospira sp.* supplement; Shanmugapriya, *et al.*, 2015).

SPR tilapia had higher levels of TCG, which was also reported by Belal *et al.* (2012) and Velasquez *et al.* (2016) in *Oreochromis sp.* fed different levels of *Arthrospira sp.*, although some authors have found the opposite effect in fatty fish, such as *O. mykiss* (Teimouri *et al.*, 2013) or *Huso huso* (Adel *et al.*, 2016). Adel *et al.* (2016) also observed more lipase activity in the intestines of tilapia fed *Arthrospira sp.*, which may also reflect increased lipid digestion and TCG in plasma. In addition, carotenoids in *A. platensis* can facilitate absorption of dietary lipids (Iwata *et al.*, 1990; Teimouri *et al.*, 2013).

SPR fish had higher levels of cortisol in plasma (15.46 ± 1.5) which could imply a higher stress response (Barton & Iwama, 1991; Pottinger & Carrick, 1999) but cortisol levels were well within the normal range for this species (around 10-20 ng/ml, Balm, 1994; Vi ayan *et al.*, 1997; Barcellos *et al.*, 1999). In response to most stressors fish will exhibit an increase in plasma cortisol concentrations, which is generally followed by an elevation in plasma glucose levels. However, in the current study, no differences were found in glucose levels between the different treatments. Studies in rainbow trout (*O. mykiss*), have found a reduction of both cortisol and glucose with *A. platensis* supplementation (0 to 10%; Yeganeh *et al.*, 2015).

Increased levels of cortisol will also increase lipolysis, which raises plasma TCG and the general metabolic rate (Mommensen *et al.*, 1999). Within the relatively low ranges

of cortisol found in the current study, slightly higher levels of cortisol could favor growth and may be one of the causes for the differences in growth between treatments. Cortisol is not only an essential component of the stress response in fish, but also plays an important role in osmoregulation, growth and reproduction (Mommsen *et al.*, 1999).

Flesh pH was within normal values for tilapia between 6.4-7.0, as described by other authors (Olivera *et al.*, 2015; Hsieh *et al.*, 2011). There was no effect of supplementation on flesh pH but *rigor mortis* was resolved earlier in SPR fish, which could imply a shorter shelf life. Flesh colour was also different among treatments, with a higher chroma at 24 h *post-mortem* in CTR fish. At 24 h *post-mortem*, there was a greater absorption of light in the ranges of 470 nm-500 nm, which corresponds with the absorption spectrum of β -carotene. Carotene shows two peaks of absorbance between 400 nm and 500 nm (reflecting red-orange-yellow light). This colour change due to carotenes has also been described by other authors in *O. mykiss* (Teimouri *et al.*, 2013), *Cyprinus carpio* L. (Sun *et al.*, 2012) and *O. mossambicus* (Gomes *et al.*, 2012). James *et al.* (2006) also found a higher carotene content in *Xiphophorus helleri* fed % *Arthrospira* sp. The second range (620nm-670nm) could correspond with phycocyanin which emits fluorescence at about 650nm. An increase in blue-derived phycocyanin was mentioned by Karadal *et al.* (2017) in the colouration of the skin of Kenyi cichlids (*Maylandia lombardoi*) fed with *Arthrospira* sp.

A. platensis supplementation did not significantly modify the intestinal microbiota of SPR tilapia. The microbiota identified were similar to controls and within the range of other studies performed in *Oreochromis* sp. At the phylum level, Proteobacteria and Fusobacteria (Fan *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2016) predominate, although in Giatsis *et al.* (2016), Acidobacteria occupied the niche of Proteobacteria, dominating the population. We found similar results in CTR-056, CTR-FF9, CTR-FF9B, SPR-3331 and SPR-3F samples. This seems to show the existence of two ecotypes of intestinal microbiota (Figure 5). At the genus level, almost all *Fusobacterial* 16S rRNA sequences in the two treatments belonged to genus *Cetobacterium*. This result is similar than Van Kessel *et al.* (2011) in *Cyprinus carpio*, and Ran *et al.* (2016) in *O. niloticus*, where it was the dominant group for each treatment, representing 32%. *Cetobacterium* are known members of the endogenous microbiota of fish intestines (Wu *et al.*, 2010).

In this study, Fusobacteria represented 36%, while other authors such as Fan *et al.* (2013) reported 26%, Zhai *et al.* (2016) 56%, Gaikwad *et al.* (2016) 45% or Ran *et al.* (2016) 34%.

Although not all samples of the present study responded to this pattern, high values of Fusobacteria seem characteristic of *Oreochromis* sp., especially compared to other species like *H. molitrix* <12% (Ye *et al.*, 2014), *S. salar* < 7% (Gaardo *et al.*, 2016, Dehler *et al.*, 2017) or *O. mykiss* <1% (Huyben *et al.*, 2017). Merrifield & Ringo (2014) argued that the average content of Fusobacteria in common commercial fish is below 7%.

However, Proteobacteria were the most numerous *phyla*, divided into a diverse amount of *genus*, the most representative of which was *Aeromonas* (13. %), a known member of the endogenous microbiota of freshwater fish, which helps to ferment organic compounds and cellulose (Wu *et al.*, 2010), followed by *Shigella* (6.7%), which can be optional pathogen like *Aeromonas* (Wu *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2011; Van Kessel *et al.* 2011; Wu *et al.*, 2012).

Among the most representative *genus* of actinobacteria was *Propionibacterium* (5.2%) and *Mycobacterium* (2.7%), both members of the order of *Actinomycetales*, occupying the main niche of the second ecotype found.

Based on the results of this study, we conclude that *Arthrospira platensis* can improve growth in *O. niloticus* and could help to improve flesh colour, without modifying the general parameters of intestinal microbiota. On the other hand, we have observed different configurations of intestinal microbiota in *O. niloticus*, which we can categorize into two ecotypes. The predominant in our samples is Ecotype I (Fuso-Proteobacteria), with *Cetobacterium* as the dominant bacterium, and also an Ecotype II (Proteo- actinobacteria) with *proteobacteria's* *Escherichia/Shigella*, *Aeromonas*, and the *actinobacteria* *Mycobacterium* occupying the main niche. We can find these ecotypes by reviewing the data of other intestinal microbiota studies in *Oreochromis*. Zhai *et al* (2016) found a microbiota with type I distribution (Fuso-Proteobacteria), dominated by Fusobacteria at 56%, Proteobacteria at 31%, Bacteroidetes at 12% and Firmicutes at 0.5%, in its control population. Fan *et al* (2013) found the same ecotype I, formed by Fusobacteria at 26%, Proteobacteria at 25% and Firmicutes at 19%. However, Giatsis *et al.* (2016) found a population similar to ecotype II (Proteo- actinobacteria), dominated by actinobacteria above 40%, followed by Proteobacteria at 20%.

CKNOWLEDGEMENTS

This work is part of the project Cofounded by the Community of Madrid with structural funds from the European Union FEDER (INSPIR 1, Ref. S2013/ B I27 3) .

REFERENCES

- Abdel-Tawwab, M., & Ahmad, M. H. (2009). Live *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 40(9), 1037-1046. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.003>
- Adel, M., Yeganeh, S., Dadar, M., Sakai, M., & Dawood, M. A. (2016). Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, humoral and mucosal immune responses and disease resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Fish & Shellfish Immunology*, 56, 436-444. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02195.x>

- Azaza, M. S., Dhraief, M. N., & Kraiem, M. M. (2008). Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. *Journal of Thermal Biology*, 33(2), 98-105. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02195.x>
- Bäckhed, F. *et al.* (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15718-15723. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02195.x>
- Baker, R. T. M., Pfeiffer, A. M., Schöner, F. J., & Smith-Lemmon, L. (2002). Pigmenting efficacy of astaxanthin and canthaxanthin in fresh-water reared Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Animal Feed Science and Technology*, 99(1-4), 97-106. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02195.x>
- Balm, P. H. M., Pepels, P. P. L. M., Helfrich, S., Hovens, M. L. M., & Bonga, S. W. (1994). Adrenocorticotrophic hormone in relation to interrenal function during stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *General and Comparative Endocrinology*, 96(3), 347-360. Retrieved from: <https://doi.org/10.1006/gcen.1994.1190>
- Barcellos, L. J., Nicolaiewsky, S., De Souza, S. M., & Lulhier, F. (1999). The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquaculture Research*, 30(11-12), 887-892. Retrieved from: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00419.x>
- Belal, E. B., & El-Hais, A. M. A. (2012). Use of spirulina (*Arthrospira fusiformis*) for promoting growth of Nile Tilapia fingerlings. *African Journal of Microbiology Research*, 6(35), 6423-6431. Retrieved from: <https://doi.org/10.5897/AJMR12.288>
- Barton, B. A., & Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1, 3-26. Retrieved from: [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G)
- Boyd, C. E., & Tucker, C. S. (2012). *Pond aquaculture water quality management*. Springer Science & Business Media.
- Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J., & Esteban, M. Á. (2008). Effects of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune parameters. *Fish and Shellfish Immunology*, 24(5), 663-668. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.10.002>
- Chamorro, G., Salazar, M., Gomes de Lima Araújo, K., Pereira dos Santos, C., Ceballos, G., & Fabila Castillo, L. (2002). Actualización en la farmacología de Spirulina (*Arthrospira*), un alimento no convencional. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 52(3), 232-240.
- Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11(4), 265-270.
- Chao, A., & Lee, S. M. (1992). Estimating the number of classes via sample coverage. *Journal of the American Statistical Association*, 87(417), 210-217. Retrieved from: <https://doi.org/10.1080/01621459.1992.10475194>
- De Jesus Raposo, M. F., de Moraes, A. M. M. B., & de Moraes, R. M. S. C. (2016). Emergent sources of prebiotics: seaweeds and microalgae. *Marine Drugs*, 14(2), 27. Retrieved from: <https://doi.org/10.3390/md14020027>
- Dehler, C. E., Secombes, C. J., & Martin, S. A. (2017). Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 467, 149-157. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.017>
- Ebeling, J. M., & Timmons, M. B. (2012). Recirculating aquaculture systems. *Aquaculture Production Systems*, 245-277. Retrieved from: <https://doi.org/10.1002/9781118250105.ch11>

- El-Haroun, E. R., Goda, . S., & Chowdhury, K. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37(14), 1473-1480. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01584.x>
- El-Sheekh, M., El-Shourbagy, I., Shalaby, S., & Hosny, S. (2014). Effect of feeding *Arthrospira platensis* (Spirulina) on growth and carcass composition of hybrid red Tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(2), 471-478. Retrieved from: https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_2_18
- Evans, F. D., & Critchley, A. T. (2014). Seaweeds for animal production use. *Journal of Applied phycology*, 26(2), 891-899. Retrieved from: <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0162-9>
- Fan, L., et al. (2017). Characterization of microbial communities in intensive GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) pond systems during the peak period of breeding. *Aquaculture Research*, 48(2), 459-472. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/are.12894>
- Fečkaninová, ., Koščová, J., Mudroňová, D., Popelka, P., & Toropilova, J. (2017). The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture. *Aquaculture*, 469, 1-8. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.042>
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S15-S28. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031>
- Gaikwad, S. S., Shouche, Y. S., & Gade, W. N. (2017). Deep sequencing reveals highly variable gut microbial composition of invasive fish Mossambicus Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Collected from two different habitats. *Indian Journal of Microbiology*, 57(2), 235-240. Retrieved from: <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0641-9>
- Gajardo, K., et al. (2016). A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research. *Scientific Reports*, 6, 30893. Retrieved from: <https://doi.org/10.1038/srep30893>
- Gamito, S. (2010). Caution is needed when applying Margalef diversity index. *Ecological Indicators*, 10(2), 550-551. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2009.07.006>
- Giatsis, C., et al. (2015). The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Scientific Reports*, 5, 18206. Retrieved from: <https://doi.org/10.1038/srep18206>
- Gomes, I. G., et al. (2012). Dietary supplementation with *Spirulina platensis* increases growth and colour of red tilapia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(3), 462-471.
- Grisdale-Helland, B., Helland, S. J., & Gatlin III, D. M. (2008). The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 283(1-4), 163-167. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.012>
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. & Paul, D. R. (2001). Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electrónica*, 4(1), 9. Retrieved from: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Haygood, A. M., & Jha, R. (2016). Strategies to modulate the intestinal microbiota of Tilapia (*Oreochromis* sp.) in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture* (0), 1-14. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/raq.12162>
- He, S., et al. (2017). Antibiotic growth promoter olaquinox increases pathogen susceptibility in fish by inducing gut microbiota dysbiosis. *Science China Life Sciences*, 60(11), 1260-1270. Retrieved from: <https://doi.org/10.1007/s11427-016-9072-6>

- Hsieh, C. W., Lai, C. H., Lee, C. H., & Ko, W. C. (2011). Effects of high-voltage electrostatic fields on the quality of Tilapia meat during refrigeration. *Journal of Food Science*, 76(6), M312-7. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02218.x>
- Huyben, D., *et al.* (2017). Effects of dietary inclusion of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus* on gut microbiota of rainbow trout. *Aquaculture*, 473, 528-537. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.024>
- Iwata, K., Inayama, T., & Kato, T. (1990). Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose-induced hyperlipidemic rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 36(2), 165-171. Retrieved from: <https://doi.org/10.3177/jnsv.36.165>
- James, R., Sampath, K., Thangarathinam, R., & Vasudevan, I. (2006). Effect of dietary spirulina level on growth, fertility, colouration and leucocyte count in red swordtail, *Xiphophorus helleri*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10524/19166>.
- Jiang, Y., *et al.* (2011). Cellulase-producing bacteria of *Aeromonas* are dominant and indigenous in the gut of *Ctenopharyngodon idellus* (Valenciennes). *Aquaculture Research*, 42(4), 499-505. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02645.x>
- Jourdan, J. P. (1999). Cultivez votre spiruline, manuel de culture artisanale de la spiruline. *Antenna Technology*. Paris, Francia.
- Karadal, O., Güroy, D., & Türkmen, G. (2017). Effects of feeding frequency and *Spirulina* on growth performance, skin colouration and seed production on kenya cichlids (*Maylandia lombardoi*). *Aquaculture International*, 25(1), 121-134. Retrieved from: <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0017-x>
- Khanzadeh, M., Fereidouni, A. E., & Berenjestanaki, S. S. (2016). Effects of partial replacement of fish meal with *Spirulina platensis* meal in practical diets on growth, survival, body composition, and reproductive performance of three-spot gourami (*Trichopodus trichopterus*) (Pallas, 1770). *Aquaculture International*, 24(1), 69-84. Retrieved from: <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9909-4>
- Koh, C. B., Romano, N., Zahrah, A. S., & Ng, W. K. (2016). Effects of a dietary organic acids blend and oxytetracycline on the growth, nutrient utilization and total cultivable gut microbiota of the red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.*, and resistance to *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture research*, 47(2), 357-369. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/are.12492>
- Korhonen, R. W., Lanier, T. C., & Giesbrecht, F. (1990). An evaluation of simple methods for following rigor development in fish. *Journal of Food Science*, 55(2), 346-348. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb06759.x>
- Leal, B. E. S., *et al.* (2017). Potential prebiotic oligosaccharides from aqueous thermopressurized phosphoric acid hydrolysates of microalgae used in treatment of gaseous steakhouse waste. *Algal Research*, 24, 138-147. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.020>
- Liu, W., *et al.* (2014). Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil. *British Journal of Nutrition*, 112(1), 15-29. Retrieved from: <https://doi.org/10.1017/S0007114514000610>
- López-Luna, J., Bermejo-Poza, R., Bravo, F. T., & Villarroel, M. (2016). Effect of degree-days of fasting stress on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 462, 109-114. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.017>
- Lu, J., Takeuchi, T., & Ogawa, H. (2003). Flesh quality of tilapia *Oreochromis niloticus* fed solely on raw *Spirulina*. *Fisheries Science*, 69(3), 529-534. Retrieved from: <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2003.00653.x>
- Lyons, P. P., Turnbull, J. F., Dawson, K. A., & Crumlish, M. (2017). Effects of low-level dietary microalgae supplementation on the distal intestinal microbiome of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*

- (Walbaum). *Aquaculture Research*, 48(5), 2438-2452. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/are.13080>
- Lv, H. Y., Zhou, Z. G., Rudeaux, F., & Respondek, F. (2007). Effects of dietary short chain fructo-oligosaccharides on intestinal microflora, mortality and growth performance of *Oreochromis aureus* ♂ × *O. niloticus* ♀. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 19(6), 691-697.
- Magurran, A. E. (2013). Measuring biological diversity. John Wiley & Sons.
- Manzano, M., Iacumin, L., Giusto, C., Cecchini, F., Patthey, C. (2012). Utilization of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to evaluate the intestinal microbiota of brown trout *Salmo trutta fario*. *Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis*, 1, 2. Retrieved from: <https://doi.org/10.4172/2325-9590.1000105>
- Merrifield, D. L., & Ringo, E. (Eds.). (2014). *Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics*. John Wiley & Sons. Retrieved from: <https://doi.org/10.1002/9781118897263>
- McCarty, M. F. (2007). Clinical potential of Spirulina as a source of phycocyanobilin. *Journal of Medicinal Food*, 10(4), 566-570. Retrieved from: <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.621>
- Michl, S. C., et al. (2017). The malleable gut microbiome of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Diet-dependent shifts of bacterial community structures. *PloS One*, 12(5), e0177735. Retrieved from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177735>
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., & Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9(3), 211-268. Retrieved from: <https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>
- Mosenthin, R., & Bauer, E. (2000). The potential use of prebiotics in pig nutrition. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 13 (Special iss.), 315-325.
- O'Sullivan, L., et al. (2010). Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. *Marine Drugs*, 8(7), 2038-2064. Retrieved from: <https://doi.org/10.3390/md8072038>
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7(7), 688-693. Retrieved from: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
- Oliveira Filho, P. R. C., et al (2015). How Stunning methods affect the quality of Nile tilapia meat. *CyTA-Journal of Food*, 13(1), 56-62. Retrieved from: <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.911211>
- Parada, J. L., de Caire, G. Z., de Mule, M. C. Z., & de Cano, M. M. S. (1998). Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Microbiology*, 45(3), 225-228. Retrieved from: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00151-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00151-2)
- Patterson, J. A., & Burkholder, K. M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 82(4), 627-631. Retrieved from: <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.627>
- Pedrotti, F. S., et al. (2015). The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of dietary carbohydrates. *Aquaculture Research*, 46(2), 472-481. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/are.12195>
- Penninks, A., Baert, K., Levorato, S., & Binaglia, M. (2017). Dyes used in aquaculture. *EFSA Journal*, 15(7). Retrieved from: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4920>
- Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., & Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(8), 781. Retrieved from: <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1281-7>
- Pottinger, T. G., & Carrick, T. R. (1999). Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. *General and Comparative Endocrinology*, 116(1), 122-132. Retrieved from: <https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7355>

- R.Team, T. R. D. C. (2008). The R project for statistical computing. Retrieved from: <http://www.r-project.org>.
- Ran, C., *et al.* (2016). Effects of dietary live and heat-inactive baker's yeast on growth, gut health, and disease resistance of Nile tilapia under high rearing density. *Fish and Shellfish Immunology*, 56, 263-271. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.07.001>
- Ringø, E., Sperstad, S., Kraugerud, O. F., & Krogdahl, Å. (2008). Use of 16S rRNA gene sequencing analysis to characterize culturable intestinal bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with cellulose or non-starch polysaccharides from soy. *Aquaculture Research*, 39(10), 1087-1100. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01972.x>
- Ringø, E., *et al.* (2010). Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 117-136. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x>
- Ringø, E., *et al.*, (2016). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquaculture Nutrition*, 22(2), 219-282. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/anu.12346>
- Shanmugapriya, B., Babu, S. S., Hariharan, T., Sivanewaran, S., & Anusha, M. B. (2015). Dietary administration of *Spirulina platensis* as probiotics on growth performance and histopathology in broiler chicks. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(2), 2650-3.
- Smith, E. P., & van Belle, G. (1984). Nonparametric estimation of species richness. *Biometrics*, 119-129. Retrieved from: <https://doi.org/10.2307/2530750>
- Sommer, T. R., D'Souza, F. M. L., & Morrissy, N. M. (1992). Pigmentation of adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture*, 106(1), 63-74. Retrieved from: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90)
- Sommer, T. R., Potts, W. T., & Morrissy, N. M. (1991). Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 94(1), 79-88. Retrieved from: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90130-Y](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90130-Y)
- Sun, X., *et al.* (2012). The effect of dietary pigments on the colouration of Japanese ornamental carp (koi, *Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 342, 62-68. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.019>
- Suzuki, T. A., & Nachman, M. W. (2016). Spatial heterogeneity of gut microbial composition along the gastrointestinal tract in natural populations of house mice. *PloS One*, 11(9). Retrieved from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163720>
- Takeuchi, T., Lu, J. U. N., Yoshizaki, G., & Satoh, S. (2002). Effect on the growth and body composition of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* fed raw Spirulina. *Fisheries Science*, 68(1), 34-40. Retrieved from: <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00386.x>
- Torrecillas, S., *et al.* (2017). Effect of fishmeal and fish oil replacement by vegetable meals and oils on gut health of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 468, 386-398. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.005>
- Turnbaugh, P. J., *et al.* (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027. Retrieved from: <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Ungsethaphand, T., Peerapornpisal, Y., Whangchai, N., & Sardud, U. (2010). Effect of feeding *Spirulina platensis* on growth and carcass composition of hybrid red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*). *Maejo International Journal of Science and Technology*, 4(2), 331-336
- van Kessel, M. A., *et al.* (2011). Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.). *AMB Express*, 1(1), 41. Retrieved from: <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-41>

- Velasquez, S. F., *et al.* (2016). Dietary Spirulina (*Arthrospira platensis*) replacement enhances performance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Phycology*, 8(2), 1023-1030. Retrieved from: <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0661-y>
- Vijayan, M. M., Pereira, C., Grau, E. G., & Iwama, G. K. (1997). Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 116(1), 89-95. Retrieved from: [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(96\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(96)00124-7)
- Wang, A. R., Ran, C., Ringø, E., & Zhou, Z. G. (2017). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Reviews in Aquaculture* Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/raq.12191>.
- Wu, S., *et al.* (2010). Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture*, 303(1-4), 1-7. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.025>
- Wu, S., Tian, J., Wang, G., Li, W., & Zou, H. (2012). Characterization of bacterial community in the stomach of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 2165-2174. Retrieved from: <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1022-5>
- Ye, L., Amberg, J., Chapman, D., Gaikowski, M., & Liu, W. T. (2014). Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish. *The ISME Journal*, 8(3), 541. Retrieved from: <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.181>
- Yeganeh, S., Teimouri, M., & Amirkolaie, A. K. (2015). Dietary effects of *Spirulina platensis* on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Research in Veterinary Science*, 101, 84-88. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.06.002>
- Zarrouk, C. (1966). Contribution a l'etude d'une *Cyanophyceae*. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima*. *Thesis. University of Paris, France*.
- Zhai, Q., *et al.* (2017). Effect of dietary probiotic supplementation on intestinal microbiota and physiological conditions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under waterborne cadmium exposure. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(4), 501-513. Retrieved from: <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0819-x>
- Zhou, Z., Ding, Z., & Huiyuan, L. V. (2007). Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival, and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(2), 296-301. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00099.x>.
- Zhou, Z., *et al.* (2009). The effects of dietary yeast culture or short-chain fructo-oligosaccharides on the intestinal autochthonous bacterial communities in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus*♀ × *Oreochromis aureus*♂. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40(4), 450-459. Retrieved from: <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00272.x>
- Zhou, Z., *et al.* (2013). Enhancement of growth and intestinal flora in grass carp: the effect of exogenous cellulase. *Aquaculture*, 416, 1-7. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.023>.

TABLE 1 Summary of publications that have studied analysed microbiota in *Oreochromis* species.

Reference	Species	Country /System	Kit Isolation	Primer F-R (5'-3')	Amplification	Tax. Program	Principal Bacteria	± %
Fan <i>et al.</i> , 2013	<i>Oreochromis niloticus</i>	Wuxi, China /Ponds	PowerSoil DNA Kit (MO BIO, Carlsbad, CA, USA)	27F 338RI 388RII	5'-GAG TTT GAT CMT GGC TCA G-3' 5'-GCW GCC TCC CGT AGG AGT-3' 5'-GCW GCC ACC CGT AGG TGT-3'	QuantiFluor TM-ST fluorometer	QIIME	Fusobacteria 26.0 Protobacteria 25.6 Firmicutes 19.4
Zhai <i>et al.</i> , 2016	<i>Oreochromis niloticus</i>	Wuxi, China /Tanks	E.Z.N.A DNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, US)	515F 907R	5'-BCode-GTG CCA GCM GC CGC GG-3' 5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3'	Illumina MiSeq	QIIME	Fusobacteria 57.9 Potobacteria 30.7 Bacteroidetes 11.8
Giatsis <i>et al.</i> , 2015	<i>Oreochromis niloticus</i>	Velden, Netherlands /Recirculation aquaculture system & active suspension	DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)	27F 338RI 388RII	5'-GAG TTT GAT CMT GGC TCA G-3' 5'- GCW GCC TCC CGT AGG AGT-3' 5'-GCW GCC ACC CGT AGG TGT-3'	454 pyrosequencing	QIIME	Actinobacteria 43.2 Protobacteria 21.7 Planctomycetes 16.6
Ran <i>et al.</i> , 2015	<i>Oreochromis niloticus</i>	Beijing, China /Tanks	NGS toolkits	349F 806R	5'-GYG CAS CAG KCG MGA AW-3' 5'-GGA CTA CHV HHH TWT CTA AT-3'	Illumina Hiseq2500	UCLUST v1.2.22	Fusobacteria 54.0 Potobacteria 34.0
Gaikwad <i>et al.</i> , 2017	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Maharashtra, India River, Mula	Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)	27F 519R	5'-AGR GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' 5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3'	Illumina Miseq	QIIME	Fusobacteria 53.2 Protobacteria 26.8 Firmicutes 6.9
Gaikwad <i>et al.</i> , 2017	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Maharashtra, India Lake, Talegaon Dabhade	Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)	27F 519R	5'-AGR GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' 5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3'	Illumina Miseq	QIIME	Fusobacteria 36.8 Protobacteria 23.6 Actinobacteria 15.0

TABLE 2 Proximate composition of experimental diets Control (CTR) and *A. platensis* (SPR) (DM dry matter; CP crude protein; EE ether extract, NDF neutral detergent fibre, DF acid detergent fibre, DL acid detergent lignin and CE crude energy).

	CTR	SPR
Fish meal (%)	35	35
Soybean meal (%)	23.5	23.5
Wheat meal (%)	6,5	6.5
Mix mineral-vitamin* (%)	1	1
<i>Arthrospira platensis</i> (%)	0	3
DM (%)	92.60	92.60
Ash (%)	7.39	7.37
CP (%/DM)	44.59	44.3
EE (%/DM)	6.39	6.44
NDF (%/DM)	26.4	26.23
ADF (%/DM)	4.9	5.05
ADL (%/DM)	0.6	0.7
CE (kcal /g MS)	5.00	4.9

* Vitamin-mineral mixture: vitamin A, 500IU; vitamin D, 100IU; vitamin E, 75,000 mg; vitamin K, 20,000 mg; vitamin B1, 10,000 mg; vitamin B3, 30,000 mg; vitamin B6, 20,000 mg; b12 vitamin, 100 mg; vitamin D, 60,000 mg; niacin, 200,000 mg; folic acid, 500 mg; biotin, 0.235 mg; selenium, 0.2 g; iron, 80 g; manganese, 100 g; zinc, 80 g; copper, 15 g; potassium chloride, 4 g; manganese oxide, 0.6 g; sodium bicarbonate, 1.5 g; iodine, 1.0 g; cobalt, 0.25 g

TABLE 3 Means±SD of growth parameters of tilapia fed control feed (CTR) or 3% *A. platensis* (SPR) at the initial day 0 (start of experiment) and on final day 50 (end of experiment).

	CTR (n=50)	SPR (n=50)	p-values
Initial body weight (g)	109.17 ± 4.19	109.06 ± 4.23	0.9
Final body weight (g)	236.65 ± 9.73 ^b	259.39 ± 9.2 ^a	0.04
ADG fish (g/d)	2.50±0.13 ^b	2.95±0.13 ^a	0.02
	CTR (n=2)	SPR (n=2)	p-values
Division FCR	1.37 ^a	1.14 ^b	0.01
Division TFI (g)	43.0	43.0	1
Division Survival (%)	100	100	1

*average daily gain (ADG), feed conversion rate (FCR) and total feed intake (TFI).

TABLE 4 Means $\pm$ SEM of haematological parameters of *O. niloticus* fed control feed (CTR) or 3% *A. platensis* (SPR).

	CTR (n=20)	SPR (n=20)	p-value
Cortisol (ng/ml)	10.10 $\pm$ 1.2 ^b	15.46 $\pm$ 1.5 ^a	0.02
Glucose (mg/100 ml)	89.23 $\pm$ 3.5	84.23 $\pm$ 3.6	0.57
Lactate (mmol/L)	1.44 $\pm$ 0.1	1.43 $\pm$ 0.1	0.73
CPK (U/I)	3052.4 $\pm$ 409.3	3115.3 $\pm$ 414.5	0.84
Triglycerides (mg/100 ml)	61.8 $\pm$ 8.7 ^b	110.5 $\pm$ 7.4 ^a	<0.001
Leucocyte (ml/UI)	8.68 $\pm$ 0.6	8.24 $\pm$ 0.6	0.30
Haematocrit (%)	37.33 $\pm$ 1.1	37.39 $\pm$ 1.1	0.55

TABLE 5 Mean ($\pm$ SD) rigor angle, pH, and flesh colour parameters (L*, a*, b*, chroma C* and hue h*) of *O. niloticus* fed control feed (CTR) or 3% *A. platensis* (SPR).

		CTR (n=20)	SPR (n=20)	p-values
Rigor angle (°)	0h	45.06 $\pm$ 1.26	42.08 $\pm$ 1.26	0.21
	6h	6.62 $\pm$ 1.98	8.32 $\pm$ 1.53	0.50
	24h	0.14 $\pm$ 0.14	0.12 $\pm$ 0.12	0.45
	48h	2.81 $\pm$ 0.81 ^b	11.46 $\pm$ 1.06 ^a	<0.001
Flesh pH	0h	6.81 $\pm$ 0.04	6.84 $\pm$ 0.04	0.69
	6h	6.79 $\pm$ 0.02	6.73 $\pm$ 0.04	0.15
	24h	6.43 $\pm$ 0.02	6.37 $\pm$ 0.03	0.09
Flesh colour				
L*	0h	47.33 $\pm$ 2.72	49.30 $\pm$ 3.60	0.06
	24h	48.95 $\pm$ 1.65	49.08 $\pm$ 1.49	0.79
a*	0h	-1.86 $\pm$ 0.3	1.84 $\pm$ 0.29	0.77
	24h	-1.78 $\pm$ 0.35 ^b	-1.42 $\pm$ 0.42 ^a	<0.01
b*	0h	-0.39 $\pm$ 0.81	-0.739 $\pm$ 0.71	0.16
	24h	-4.74 $\pm$ 0.87 ^b	-4.26 $\pm$ 0.61 ^a	0.05
C*	0h	2.06 $\pm$ 0.35	2.09 $\pm$ 0.32	0.78
	24h	5.09 $\pm$ 0.75 ^a	4.51 $\pm$ 0.57 ^b	<0.01
h*(°)	0h	12.96 $\pm$ 22.15	21.40 $\pm$ 18.86	0.33
	24h	68.70 $\pm$ 6.30	71.50 $\pm$ 6.28	0.17

TABLE 6 Mean ($\pm$ SEM) Significant differences in spectral reflectance of *O. niloticus* meat at 24 h, on two different fed treatments, control fed (CTR) and *A. platensis* supplement fed (SPR)

wavelength	CTR(n=20)	SPR(n=20)	p-value
470nm	21.23 $\pm$ 1.18 ^b	22.14 $\pm$ 1.51 ^a	0.04
480nm	20.87 $\pm$ 1.19 ^b	21.84 $\pm$ 1.53 ^a	0.03
490nm	20.22 $\pm$ 1.18 ^b	21.22 $\pm$ 1.52 ^a	0.03
500nm	19.52 $\pm$ 1.16 ^b	20.45 $\pm$ 1.50 ^a	0.04
620nm	16.76 $\pm$ 1.43 ^b	17.88 $\pm$ 1.93 ^a	0.04
630nm	16.88 $\pm$ 1.48 ^b	18.11 $\pm$ 2.03 ^a	0.04
640nm	16.87 $\pm$ 1.51 ^b	18.11 $\pm$ 2.06 ^a	0.04
650nm	16.93 $\pm$ 1.55 ^b	18.16 $\pm$ 2.09 ^a	0.03
660nm	16.99 $\pm$ 1.57 ^b	18.21 $\pm$ 2.10 ^a	0.04
670nm	17.11 $\pm$ 1.58 ^b	18.21 $\pm$ 2.11 ^a	<0.05

TABLE 7 Diversity indices calculated by QIIME software comparing the gut microbiome of *O. niloticus* fed control feed (CTR) or 3% *A. platensis* (SPR). Operational taxonomic units (OTUs) are defined at 97% sequence similarity.

	Taxa S	Individuals	Shannon H	Simpson 1-D	Margalef	Chao-1
CTR_056A	71	209538	3.66	0.92	58.11	774.30
CTR_13B6	431	441930	2.93	0.84	33.08	498.30
CTR_CEE9	384	246371	1.73	0.60	30.85	500.20
CTR_CEEB	469	307394	2.72	0.84	37.04	531.90
CTR_E0BD	592	355241	2.68	0.78	46.24	679.10
CTR_FF98	498	169468	2.47	0.76	41.28	588.40
CTR_FF9B	429	387646	2.92	0.84	33.26	520.90
CTR_FF9B	592	357727	2.57	0.81	46.22	664.90
SPR_055B	412	365829	2.85	0.84	32.08	466.50
SPR_3331	515	200177	2.44	0.80	42.11	606.70
SPR_3E31	385	349497	2.52	0.75	30.08	431.50
SPR_3FAA	558	423622	3.75	0.93	42.99	690.00
SPR_CEEF	356	456785	2.55	0.79	27.24	406.40
SPR_D415	607	437080	2.41	0.74	46.66	681.80
SPR_FB22	332	286631	1.75	0.70	26.34	393.10
SPR_FFDC	466	475336	2.91	0.85	35.57	541.10
CTR_(Mean $\pm$ SEM)	513.50 $\pm$ 164	309414 $\pm$ 93849	2.71 $\pm$ 0.54	0.80 $\pm$ 0.1	40.76 $\pm$ 9.2	594.75 $\pm$ 101.4
SPR_(Mean $\pm$ SEM)	453.88 $\pm$ 99	374369 $\pm$ 94171	2.65 $\pm$ 0.57	0.80 $\pm$ 0.1	35.38 $\pm$ 7.7	527.14 $\pm$ 120.9
p-value	0.766	0.188	0.8246	0.977	0.225	0.246

FIGURES

FIGURE 1 Relative abundance of bacteria phyla in the intestines of eight individual *O. niloticus* fed control feed (CTR) or 3% *A. platensis* (SPR) including treatment means and total means.

FIGURE 2 Relative abundance of bacteria *genus* in the intestine of *O. niloticus* fed control feed (CTR) or 3% *A. platensis* (SPR).

FIGURE 3 Cluster similitude analysis of gut bacteria from eight individual *O. niloticus* fed control feed (CTR) or 3% *A. platensis* (SPR) using Bray-Curtis test (PAST software, 2017).

mykiss (Michl et al., 2017)

mykiss (Huyben et al., 2017)

s, river (Gaikwad et al., 2016)

s, lake (Gaikwad et al., 2016)

FIGURE 4 Spectral reflectance curves of *O. niloticus* flesh at 0 h and 24 h post-mortem, on two different fed treatments, control fed (CTR) in orange and *A. platensis* supplement fed (SPR) in green.

*space between blue and orange bars mark p-value ranges

FIGURE 5 Cluster similitude analysis of gut bacteria of different *Oreochromis sp.* studies; Using Bray-Curtis test. Using mean data from those contributed by the fish control of the various studies performed by the authors.

³Dep. de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain.

ANEXO 2 KRONA

SPR 3FAA

SPR FFDC

SPR 3331

SPR 3E31

SPR FB22

SPR 055B

ANEXO 3 ARDUINO

SOFTWARE

```
//Sample using LiquidCrystal library
#include <LiquidCrystal.h>

//select the pins used on the LCD panel
LiquidCrystal lcd(8, 9, 4, 5, 6, 7);

// define some values used by the panel and buttons
int lcd_key = 0;
int adc_key_in = 0;

#define btnRIGHT 0
#define btnUP 1
#define btnDOWN 2
#define btnLEFT 3
#define btnSELECT 4
#define btnNONE 5

//LEDs pins
int red =2; // Pin de conexión del carro de leds rojos.
intGreen =12; // Pin de conexión del carro de leds azules.
int i =0; // pin de conexión del calentador.
int blue =11; // Pin de conexión del carro de leds azules.
int laser =3; // Termometro pins
int analogtemp=3; // Pin de Conexión analogico del sensor de temperatura LM35
int tempmx =35; // Selector de temperatura maxima.
int tempmn =25; // Selector de temperatura minima.
float temp =0;
float turb =0;
float tempr;
float tempg;
float tempb; // termometro read
int temperatura () {
    temp = analogRead(analogtemp); // lee el valor de tensión del pin
    returntemp;
}

// Lectura de los botones del shield LCD
intread_LCD_buttons(){
    adc_key_in = analogRead(0);
    // read the value from the sensor
    // my buttons when read are centered at these valies: 0, 144, 329, 504, 741
```

```

        // we add approx 50 to those values and check to see if we are close
if(adc_key_in > 1000) return btnNONE;
        // We make this the 1st option for speed reasons since it will be the most
        likely result
        // For V1.1 us this threshold
if (adc_key_in < 50)         return      btnRIGHT;
if (adc_key_in < 250)        return      btnUP;
if (adc_key_in < 400)        return      btnDOWN;
if (adc_key_in < 450)        return      btnLEFT;
if (adc_key_in < 1050)       return      btnSELECT;
*/

        // For V1.0 comment the other threshold and use the one below:
if (adc_key_in < 50)         return      btnRIGHT;
if (adc_key_in < 195)        return      btnUP;
if (adc_key_in < 380)        return      btnDOWN;
if (adc_key_in < 555)        return      btnLEFT;
if (adc_key_in < 790)        return      btnSELECT;
*/

        // when all others fail, return this...
return btnNONE;
}

voidsetup(){
    lcd.begin      (16, 2);           // start the library
    lcd.setCursor  (0,0);
    lcd.print      ("TURBIDEZ");      // print a simple message
    Serial.begin   (960);
    pinMode        (3, OUTPUT);       //laser
    pinMode        (11, OUTPUT);      //LEDs Azule
    pinMode        (12, OUTPUT);      //LEDs Verde
    pinMode        (2, OUTPUT);/      /LEDS Rojo
}

voidloop(){
    lcd_key = read_LCD_buttons();     // read the buttons
    switch (lcd_key) {                // depending on which button was pushed, we
                                     // perform an action

        case btnRIGHT: {
            digitalWrite(red, HIGH);  // enciende el led rojo
            digitalWrite(green, LOW);  // enciendo el led verde
            digitalWrite(blue, LOW);   // enciendo el led azul
            digitalWrite (laser,LOW);  // encendido laser
            delay(500);

```

```

    temperatura ();          // lee la temperatura
    Serial.print(temp);      // escribe la temperatura ene l puerto de serie
    Serial.println("R");

    lcd.setCursor(9,1);      // move cursor to second line "1" and 9
                              spaces over
    lcd.print(temp);
    lcd.print("R");
break;
}

case btnLEFT: {
    digitalWrite(red, LOW);  // enciende el led rojo
    digitalWrite(green, HIGH); // enciendo el led verde
    digitalWrite(blue, LOW); // enciendo el led azul
    digitalWrite(laser,LOW); // encendido laser
    delay(500);

    temperatura ();          // lee la temperatura
    Serial.print(temp);      // escribe la temperatura ene l puerto
                              de serie
    Serial.println("G");

    lcd.setCursor(9,1);      // move cursor to second line "1" and
                              9 spaces over
    lcd.print(temp);
    lcd.print("G");
break;
}

case btnUP: {
    digitalWrite(red, LOW);  // enciende el led rojo
    digitalWrite(green, LOW); // enciendo el led verde
    digitalWrite(blue, HIGH); // enciendo el led azul
    digitalWrite (laser,LOW); // encendido laser
    delay(500);

    temperatura ();          // lee la temperatura
    Serial.print(temp);      // escribe la temperatura ene l puerto de serie
    Serial.println("B");

    lcd.setCursor(9,1);      // move cursor to second line "1" and
                              9 spaces over
    lcd.print(temp);
    lcd.print("B");

```

```

break;
}

case btnDOWN: {
    digitalWrite(red, HIGH);    // enciende el led rojo
    digitalWrite(green, HIGH); // enciendo el led verde
    digitalWrite(blue, HIGH)    ;// enciendo el led azul
    digitalWrite (laser,LOW);   // encendido laser
    delay(500);

    temperatura ();             // lee la temperatura
    Serial.print(temp);         // escribe la temperatura ene l puerto de serie
    Serial.println("W");

    lcd.setCursor(9,1);         // move cursor to second line "1" and
                                // 9 spaces over

    lcd.print(temp);
    lcd.print("W");
break;
}
case btnSELECT: {
    digitalWrite(red, LOW); // enciende el led rojo
    digitalWrite(green, LOW);// enciendo el led verde
    digitalWrite(blue, LOW);// enciendo el led azul
    digitalWrite (laser,HIGH);// encendido laser
    delay(500);

    temperatura ();             // lee la temperatura
    Serial.print(temp);         // escribe la temperatura ene l puerto de serie
    Serial.println("L");
    lcd.setCursor(9,1);         // move cursor to second line "1" and
                                // 9 spaces over

    lcd.print(temp);
    lcd.print("L");
break;
}
}
}

```