

**Diferencias y efectos observados en el crecimiento y salud de la especie *Chelon labrosus* (Risso, 1827), alimentada con piensos comerciales de trucha y de tilapia en sistemas de acuicultura de flujo abierto y de recirculación de agua.**

**Observed differences and effects in the growth and health of *Chelon labrosus* (Risso, 1827), fed with commercial trout and tilapia feeds in Open Flow and Recirculatory Aquaculture systems.**

Javier Goikoetxea Sádaba

Máster Universitario en Biología Marina: Biodiversidad  
y Conservación, septiembre 2020

Tutor Externo PiE-UPV/EHU: Dr. Xabier Lekube Iturrioz

Supervisor PiE-UPV/EHU: Dr. Urtzi Izagirre Aramaiona

Tutora Académica: Dra. Covadonga Rodríguez González

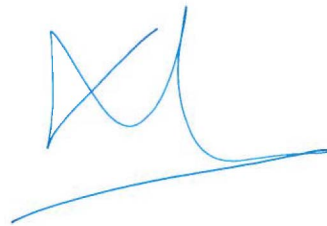
La **Dra. Covadonga Rodríguez González**, Profesora Titular del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Universidad de La Laguna y el **Dr. Xabier Lecube Iturrioz**, Investigador Postdoctoral de la Estación Marina de Plentzia (PiE-UPV/EHU), como Tutora Académica y Tutor Externo, respectivamente,

DECLARAN:

Que la memoria presentada por el alumno, **D. Javier Goikoetxea Sádaba** titulada “Diferencias y efectos observados en el crecimiento y salud de la especie *Chelum labrosus*, (Risso 1827) alimentada con piensos comerciales de trucha y de tilapia en sistemas de acuicultura de flujo abierto y de recirculación de agua, ha sido realizada bajo su dirección y consideran que reúne todas las condiciones de calidad y rigor científico requeridas para optar a su presentación como Trabajo de Fin de Máster, en el Máster Oficial de Postgrado de Biología Marina: Biodiversidad y Conservación de la Universidad de La Laguna, curso 2019-2020.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente informe favorable.

Universidad de La Laguna, 4 de septiembre de 2020.



Fdo. Dra Covadonga Rodríguez González

Fdo. Dr. Xabier Lecube Iturrioz

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2772707 Código de verificación: 1AyhoyAm

Firmado por: Covadonga Rodríguez González  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 04/09/2020 14:14:50

## Índice

Introducción	1
Objetivo	5
Material y métodos	6
Condiciones de cría y base experimental	6
Alimentación	9
Muestreo	10
Índices de rendimiento y salud	12
Análisis de datos	12
Histología	13
Detección de lípidos neutros	14
Resultados	15
Desarrollo del crecimiento (Peso – Longitud)	15
Comparación de los sistemas OFS y RAS respecto a la longitud y el peso	19
Relación Longitud – Peso	21
Índices de rendimiento nutricional	21
Índices de salud	22
Análisis histológico e histoquímico de muestras de tejido de hígado e intestino	23
Discusión	26
Conclusión	31
Consideraciones finales	32
Bibliografía	32
Agradecimientos	36

## Abstract

In the last decades aquaculture has been considered the most feasible solution to meet the growing demand for food from an estimated world population of 9,8 billion people in 2050, given the increase in fish consumption and the stagnation of production from other food sectors. In Europe, the aquaculture sector needs to establish a series of pioneer species that allow it to expand and increase its production. One of these species is a member of the family *mugilidae*, *Chelon labrosus*, whose interest lies in its omnivorous, euryhaline, and eurythermal nature; which facilitates its cultivation in economic and environmental sustainability terms. The present study compares the effects in growth and health, based in morphological and histological methods, of *C. labrosus* fed with commercial trout and tilapia feeds, using both open flow and recirculatory aquaculture systems. The results obtained show a good performance of the tilapia feed in terms of protein use and growth rate, although the individuals present lipids accumulation in the liver. The individuals fed with trout feed had greater sizes and weight, but at the same time a greater accumulation of perivisceral and intestinal fats. The results are discussed in order to assess future directions of sustainable and specific formulation of feeds for *C. labrosus* aquaculture.

**Keywords:** *Chelon labrosus*, aquaculture, trout pellets, tilapia pellets, OFS, RAS.

## Resumen

La acuicultura ha sido considerada en las últimas décadas la solución más factible de cara a suplir la creciente demanda de alimento de una población mundial estimada de 9,8 billones de personas en 2050, dado el aumento de consumo de pescado y el estancamiento de la producción de otros sectores de la alimentación. En Europa, el sector de la acuicultura requiere establecer una serie de especies pioneras que le permita expandirse y aumentar su producción. Una de estas especies es el mugílido *Chelon labrosus*, cuyo interés reside en su naturaleza omnívora, eurihalina y euriterma; facilitando su cultivo en términos económicos y de sostenibilidad ambiental. En el presente estudio se comparan los efectos en el crecimiento y en la salud de los ejemplares, a partir de métodos morfológicos e histológicos, de individuos de *C. labrosus* alimentados con pienso comercial de trucha y de tilapia, cultivados tanto en sistemas de flujo abierto como de recirculación de agua. Los resultados obtenidos muestran un buen rendimiento del pienso de tilapia en cuanto al aprovechamiento proteico y la tasa de crecimiento, aunque los individuos presentan acumulación de lípidos en el hígado. Los individuos alimentados con pienso de trucha presentaron tallas y peso mayores, pero a su vez una mayor acumulación de grasa perivisceral e intestinal. La discusión de los resultados servirá para evaluar futuras vías en la formulación de piensos sostenibles y específicos para el cultivo de *C. labrosus* en acuicultura.

**Palabras clave:** *Chelon labrosus*, acuicultura, pienso de trucha, pienso de tilapia, OFS, RAS.

## Introducción

La acuicultura se define como la cría o cultivo de organismos acuáticos, en cualquiera de sus fases, con técnicas encaminadas a hacer su producción más eficiente. Esta abarca una amplia diversidad de especies para su producción, tales como peces, moluscos, crustáceos y algas; que son cultivados con distintos propósitos, como lo son su consumo directo, la repoblación en zonas donde las poblaciones han sufrido una fuerte regresión, la acuariología en el caso de algunos peces exóticos, e incluso la obtención de subproductos de aplicación biotecnológica.

La evolución de este sector ha sido progresiva y relativamente rápida, marcada por un aumento considerable de esta actividad en las décadas de 1980 y 1990 con unas tasas de crecimiento anuales del 11,3 % y el 10 % respectivamente. En el periodo comprendido entre 2000 y 2016, el crecimiento medio anual descendió al 5,8 %, hecho posiblemente ocasionado por el aumento de regulaciones y restricciones aplicadas a este sector (FAO, 2018). Sin embargo, este hecho no ha eclipsado la contribución de la acuicultura a la producción mundial de pescado, que ha aumentado de forma constante hasta llegar al 46,8 % en 2016, lo que supone un aumento con respecto al 25,7 % del año 2000 (SOFIA, 2018). Según la FAO 2020, este valor aún se mantiene más o menos constante, representando la acuicultura el 46 % de la producción total y el 52 % del pescado para consumo humano.

La producción mundial de pescado en 2018 se estima que ha alcanzado alrededor de 179 millones de toneladas, de las cuales 156 millones de toneladas fueron destinadas al consumo humano, equivalente a 20,5 kg *per capita*. Siendo así, la producción mundial de la pesca de captura alcanzó una cifra récord de 96, 4 millones de toneladas, mostrando un aumento del 5,4% en comparación con la media de los tres años anteriores, impulsado principalmente por la pesca de captura marina. Por otro lado, la acuicultura alcanzó otro récord histórico a nivel de producción mundial con 114,5 millones de toneladas de peso vivo, desglosadas en 82,1 millones de toneladas de animales acuáticos, 32,4 millones de toneladas de algas acuáticas y 26000 toneladas de conchas marinas ornamentales y perlas. Estas cifras hacen vigente el estancamiento de la pesca de captura en valores cercanos a 90 millones de toneladas desde la década de los 80, frente al aumento considerable de la producción de pescado por parte de la acuicultura, con un ascenso de 59,7 millones de toneladas de media en el periodo 2006-2015 a 82,1 millones de toneladas de pescado en 2018. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el 89 % de la producción acuícola mundial en cuanto al cultivo de animales acuáticos pertenece a Asia (FAO, 2020), lo que pone de manifiesto que, a pesar de llevar una trayectoria ascendente, la acuicultura aún se encuentra lejos de su máximo desarrollo en el resto de países.

En Europa, la acuicultura continúa experimentando un declive de su producción, con un descenso del 3,9 % en 2015 a un 3,75 % de producción en 2018, aunque cabe destacar un ligero repunte respecto al 3,7 % de producción en 2016 (FAO, 2020). Ese mismo año, la acuicultura en Europa registro datos estimados de producción de pescado de 2,3 millones de toneladas, de las cuales el 70 % de la producción total correspondía a especies marinas, un 16 % a especies dulceacuícolas y un 14 % a especies mediterráneas. Noruega es el mayor productor acuícola europeo, con un 58 % del suministro total, produciendo principalmente salmón y trucha. Le siguen otros países con una producción superior a 100000 toneladas al año, como Turquía, Inglaterra, Grecia, Francia, Italia y España; esta última caracterizada por su elevada producción de moluscos bivalvos respecto al total producido (82,5 %) (FEAP, 2016; FAO, 2020). Las principales especies cultivadas en Europa son el mejillón mediterráneo (26 %), el salmón atlántico (14 %), la ostra del Pacífico (11 %) y la trucha arcoíris (11 %), constituyendo más de la mitad de la producción total europea en peso. Otras especies marinas cultivadas, pero en menor proporción, son también la dorada, el rodaballo, la lubina y la carpa (STECF, 2014; FEAP, 2016).

En las últimas décadas, la aparición de regulaciones ambientales referentes al entorno costero en varios estados miembros de la Unión Europea no ha tenido en cuenta al sector de la acuicultura, lo que ha supuesto una amenaza para la expansión y el desarrollo de esta industria. Como resultado, la mayor parte de los estados miembros no disponen de suficientes licencias que permitan un crecimiento del sector. Estos hechos, sumados a otros factores como la baja diversidad de especies cultivadas, las cuotas alimenticias, las restricciones del tamaño de granja y diversos aspectos burocráticos; son los principales responsables de la falta general de crecimiento de la acuicultura en Europa (Comisión Europea, 2009; STECF, 2014).

Esta problemática supone una traba en el reto mundial para alcanzar la producción necesaria de alimento que permita suplir la demanda de una población estimada de 9,8 billones de personas en 2050. Dado que la producción de pescado por pesca extractiva ha alcanzado su máximo rendimiento, y el crecimiento anual mundial del consumo de pescado (3,1 % en 2018) ha duplicado el crecimiento demográfico (1,6 %), poniendo de manifiesto que el sector pesquero es fundamental para alcanzar la meta de la FAO; la acuicultura se presenta como el único medio para suplir la demanda y suministro de proteína de pescado frente al rápido crecimiento demográfico del mundo, así como para contribuir al crecimiento económico. Siendo así, de los 179 millones de toneladas de la producción pesquera total en 2018, cerca del 88 % fue empleada para el consumo humano directo, con una estimación de consumo per cápita de 20,5 kg. A su

vez, en 2017 el pescado representó alrededor del 17 % de la proteína de origen animal y el 7 % del total de proteínas consumidas en el mundo (FAO, 2020).

Junto a esta tendencia de apostar por el sector acuícola como solución factible y viable de cara al suministro de alimento global, surgió a finales del siglo 20 una percepción sostenible sobre el uso de los recursos finitos, poniendo de manifiesto la necesidad de una buena gestión de estos, sin degradar en exceso el medio ambiente y empleando medios apropiados que permitan una viabilidad económica aceptable para la sociedad de las comunidades interesadas. Por consiguiente, es necesario que el aumento de la demanda de especies acuícolas para consumo sea suplido a su vez por una demanda de productos de acuicultura sostenibles y de bajo impacto ambiental.

Uno de los principales retos para alcanzar una producción acuícola sostenible consiste en la búsqueda de alternativas alimenticias que puedan suplir la actual demanda de aceites y harinas de pescado procedentes de la pesca extractiva, empleadas para alimentar a la mayoría de las especies con las que actualmente se trabaja en este sector. Entre las soluciones más factibles se encuentra el diseño de nuevos piensos con una mayor composición vegetal que garanticen la productividad del cultivo, de manera que la explotación de los caladeros naturales se vea reducida por el descenso de la demanda de pescado para usos no alimenticios directos, permitiendo su progresiva recuperación. Al mismo tiempo, otra solución óptima consiste en el establecimiento de nuevas especies cultivables que sean mayormente herbívoras, pudiendo diseñar estrategias alimenticias basadas en piensos vegetales y algas ricas en omega 3 (EPA y DHA). Siguiendo este punto, la Comisión Europea inauguró en diciembre de 2013 el proyecto DIVERSIFY, con el objetivo de estudiar la viabilidad e identificar nuevas especies emergentes de peces que permitieran la diversificación y expansión de la industria acuícola europea. Estas especies emergentes fueron seleccionadas en función de su potencial biológico y socioeconómico, teniendo en cuenta factores como un crecimiento rápido y una buena comercialización en tallas grandes, pudiendo ser procesados en un amplio rango de productos capaces de satisfacer al consumidor tanto en diversidad de especies como en la accesibilidad a nuevos productos de valor añadido. Entre estas especies se encuentran la perca regia (*Agryrosomus regius*), el medregal coronado (*Seriola dumerili*), el mero de roca (*Polyprion americanus*), el halibut atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*), el mújol (*Mugil cephalus*) y la lucioperca (*Sander lucioperca*) (Robles y Mylonas, 2017).

De las especies recientemente nombradas, la más interesante de cara a su potencial como especie cultivable es el mújol (*M. cephalus*), perteneciente a la familia de los mugílidos. Los

mugílidos son considerados desde hace tiempo como uno de los grupos de especies costeras más interesantes para la acuicultura (Nash y Shehadeh, 1980; Drake *et al.*, 1984; Yúfera y Arias 2010), ya que presentan hábitos alimenticios omnívoros con tendencia a convertirse en herbívoros en estadios maduros, observándose una alimentación de los juveniles estrictamente zooplanctívora (Kottelat y Freyhof, 2007), mientras que los adultos se alimentan principalmente de diatomeas bentónicas, algas epífitas, pequeños invertebrados y detritos (De las Heras *et al.*, 2012; FishBase, 2020). Al tratarse de consumidores de la parte baja de la cadena trófica, sumado a su naturaleza eurihalina y euriterma que les permite habitar en aguas dulces, salobres y marinas con rangos amplios de temperatura (Liao, 1981), existe la posibilidad de establecer vías económicas y eficientes para su cultivo de forma extensiva (Crosetti y Cataudella, 1995). Los miembros de esta familia habitan en zonas costeras distribuidas en todo el mundo, incluyendo aguas templadas, subtropicales y tropicales; pudiendo encontrarse también en lagunas, lagos y ríos interiores (Hett *et al.*, 2011; Crosetti, 2015).

De entre las 70 especies conocidas de mugílidos, cabe destacar la especie *Chelon labrosus* (Risso, 1827), comúnmente conocida como muble, por ser considerada una de las más fácilmente cultivables (Boglione *et al.*, 1992; Kemish *et al.*, 2006, 2013). Ejemplo de ello son los cultivos extensivos y tradicionales basados en la captura de alevines salvajes en el sureste de la Península Ibérica, aunque su producción es local y con poca representatividad a nivel nacional (De las Heras *et al.*, 2012). Esta especie está ampliamente distribuida por el Mar Mediterráneo, el Sudeste del Mar Negro, el Atlántico Este y en las costas de Senegal y Cabo Verde (FishBase, 2020; Turan, 2015), pudiendo encontrarse tanto en ecosistemas interiores de aguas salobres y dulces como en ecosistemas costeros predominantemente marinos. Se trata de una especie gonocórica y ovípara, con una época de reproducción establecida en el invierno, entre los meses de noviembre y abril, dependiendo de la latitud en la que se encuentren, ya que un aumento de temperatura en el agua adelanta los procesos de maduración y reproducción (De las Heras *et al.*, 2012). Los ejemplares adultos de *C. labrosus* se alimentan de algas, desechos orgánicos y sedimentos. Además, disponen de una protuberancia en el labio superior que les permite raspar sustratos duros, ricos en organismos incrustados (Boglione *et al.*, 2006). Dadas sus cualidades, la estrategia alimenticia de *C. labrosus* puede variar en función de la proporción y disponibilidad de alimento (Freyhof y Kottelat, 2008; Sarasquete *et al.*, 2014). Estas características hacen que el cultivo de esta especie sea, *a priori*, factible económicamente en lo que se refiere a su alimentación.



Teniendo en cuenta su naturaleza eurihalina y euriterma, que le permite soportar salinidades de entre 0 y 90 ‰ y temperaturas entre los 4 y los 35 °C respectivamente, sumado a su fácil cultivo, rápido desarrollo y el bajo esfuerzo económico que implica su alimentación; el cultivo intensivo de *C. labrosus* podría ser la mejor vía para cambiar la percepción del consumidor a cerca del sector y generar un incremento del valor de mercado de esta especie y sus relativas. Además, gracias a sus características, es posible realizar su cultivo de forma sostenible y con un impacto ambiental mínimo, por lo que sería más aceptada por el público consumidor actual, que demanda productos procedentes de la acuicultura que cumplan estos aspectos.

En esta misma línea, la Comisión Europea, a través del Gobierno del País Vasco, financió el proyecto AKURA, liderado por la Estación Marina de Plentzia (PiE- UPV/EHU), perteneciente a la Universidad del País Vasco (UPV/EHU); la Escuela de Acuicultura Kardala LHII y GAIKER Centro Tecnológico. El objetivo de este proyecto es el desarrollo de un cultivo sostenible en cautividad de *C. labrosus*, en términos de aportar trazabilidad al producto y garantizar la calidad nutricional con el menor impacto ambiental posible. Como parte de este proyecto, el presente estudio se basa en un análisis comparativo del cultivo de *C. labrosus*, observando las diferencias en términos de desarrollo en cuanto al uso de dos piensos de distinta composición nutricional, un pienso comercial para tilapia y un pienso para trucha; empleando sistemas tanto de flujo abierto (OFS) como de recirculación de acuicultura (RAS). El pienso comercial de trucha presenta una composición diseñada para la alimentación de peces carnívoros, dado que está compuesto principalmente de harinas y aceites de pescado; mientras que el pienso de tilapia presenta una composición más adecuada para la alimentación de peces omnívoros, ya que sus componentes principales son carbohidratos e ingredientes de origen vegetal. Mediante este estudio se pretende determinar qué combinación de pienso y sistema de cultivo ofrece el mejor rendimiento para el crecimiento y desarrollo de *C. labrosus*. La realización de este estudio permitirá dar más luz a futuras investigaciones sobre los requerimientos nutricionales necesarios para el buen desarrollo de la especie, pudiendo formular una dieta específica para mubles que cumpla con los requerimientos de sostenibilidad y bajo impacto ambiental.

## **Objetivo**

El objetivo del presente trabajo consiste en observar y comparar los efectos de los piensos comerciales de tilapia y de trucha en el crecimiento y en ciertos aspectos de la salud de *C. labrosus* mediante métodos morfológicos, histológicos e histoquímicos; cultivándolos tanto en sistemas abiertos (OFS) como cerrados (RAS).

Para cumplir este objetivo, se realizará un seguimiento del crecimiento (longitud (cm) y peso (g)) por medio de biometrías de los mubles alimentados con ambos piensos y presentes en ambos sistemas de cultivo. Con los datos obtenidos, se emplearán índices como la tasa de crecimiento específico (SGR), la ratio de conversión del alimento (FCR) y el índice de aprovechamiento proteico (PER) para evaluar el rendimiento del crecimiento general de los peces según el tipo de pienso empleado. A su vez, también serán empleados otros parámetros como el índice de condición y el índice hepato-somático (HSI), que determinarán el estado de salud de los peces en función de la relación peso-longitud y del peso del hígado respecto al peso total del ejemplar, respectivamente.

Por otra parte, dado que el hígado y los intestinos son los órganos principales encargados de la digestión, absorción y almacenamiento de nutrientes; se emplearán técnicas histológicas para estudiar posibles diferencias o patologías en dichos órganos en función del pienso aportado, con el objetivo de observar su estado de salud. Así mismo, se emplearán métodos histoquímicos en tejidos del intestino posterior para observar la posible presencia de lípidos neutros, que marquen las diferencias en términos de aprovechamiento de nutrientes entre mubles alimentados con pienso de tilapia y los alimentados con pienso de trucha.

## **Material y métodos**

### Condiciones de cría y base experimental

Los alevines de muble (*Chelon labrosus*) empleados para la realización de este estudio fueron proporcionados por el centro de acuicultura Fauna Marina SL (Cádiz), quienes obtuvieron los ejemplares del medio natural. Dichos especímenes fueron transportados en tanques provistos de oxigenación hasta las instalaciones de la Estación Marina de Plentzia (PiE-UPV/EHU), centro de investigación de biología marina y biotecnología experimental situado en Bizkaia, perteneciente a la Universidad del País Vasco (UPV/EHU); y a las instalaciones de la escuela de acuicultura de Kardala LHII, situada en Mutriku (Gipuzkoa); centro en el que se realizó el mismo experimento de forma paralela y conjunta. En el PiE, el proceso de aclimatación de los peces se llevó a cabo en acuarios de fibra de vidrio de base cónica con sistema de flujo abierto, más comúnmente denominado “Open Flow System” (OFS), sistema que consiste en una entrada de agua de flujo continuo, obtenida por bombeo desde el mar, y una salida de desagüe para eliminar las sustancias de desecho, permitiendo la renovación de la columna de agua del acuario. Por otro lado, en Kardala se emplearon acuarios con sistemas de recirculación de acuicultura, denominados “Recirculatory Aquiculture System” (RAS), que se caracterizan por

ser sistemas que reutilizan la misma agua, ya que disponen de filtros que garantizan su limpieza en gran parte. Antes de proceder con el proceso de aclimatación, los peces fueron sometidos a una desinfección con peróxido de hidrógeno, debido a que presentaban infestación con piojos de mar (“sea lice”). En ambos sistemas, el periodo de aclimatación tuvo una duración de 30 días, en los cuales los alevines fueron alimentados con una dieta comercial rica en proteínas. El experimento fue llevado paralelamente en ambos centros, cumpliendo los objetivos y procedimientos comunes acordados, de modo que los métodos explicados en este apartado, referidos al cuidado y mantenimiento de los peces y acuarios; si bien se corresponden en mayor medida con aquellos llevados a cabo en el PiE, debe entenderse que fueron realizados de igual manera o de manera muy similar en Kardala LHII.



Figura 1. Imágenes en microscopio óptico de los parásitos (“sea lices”) presentes en los juveniles de *Chelonia labrosus* antes de comenzar el experimento. Obtenidas del banco de muestras del PiE.

Tras el periodo de aclimatación, y previamente al inicio del experimento; se tomaron diez individuos de cada sistema de cultivo (OFS y RAS) para ser diseccionados y empleados como muestras control. Para llevar a cabo el experimento, se separaron los individuos en dos grupos experimentales (trucha y tilapia) y se distribuyeron en dos acuarios de fibra de vidrio de base cónica de 1000 litros de capacidad con sistema de aireación, uno para cada tratamiento. Ambos tanques presentaban medios similares, con una salinidad del 33 % y temperaturas entre 17,5 y 18,5 °C. En un inicio, se planteó mantener la temperatura de los acuarios estable en los rangos mencionados a lo largo del año, pero debido a un fallo en el intercambiador de placas de titanio no fue posible, por lo que la temperatura pasó a variar estacionalmente a partir de mediados del periodo T2 – T4, llegando a presentar temperaturas de entre 14 y 15 °C en diciembre de 2019.

En los acuarios de Kardala (RAS), el medio también presentaba una salinidad del 33 ‰ y la temperatura variaba estacionalmente, siendo de 2 a 3 °C superior a la del mar. En cada sistema de cultivo un grupo experimental se alimentó con pienso de tilapia, mientras que el otro grupo se alimentó con pienso de trucha. En cada tanque se introdujeron aproximadamente 250 individuos de *C. labrosus*, de peso y talla iniciales medios de 26,08 g ± 7,86 y 12,60 cm ± 1,27 (grupo trucha OFS); 27,46 g ± 7,32 y 12,84 cm ± 1,24 (grupo tilapia OFS); 27,84 g ± 7,57 y 13,04 cm ± 1,55 (grupo trucha RAS) y 29,49 g ± 9,86 y 13,14 cm ± 1,51 (grupo tilapia RAS), para cada grupo experimental. Según las recomendaciones de la compañía de la que se obtuvieron dichos piensos, los peces fueron alimentados con una cantidad de pienso equivalente a 2,5 ‰ su peso corporal dos veces al día. A medida que el experimento iba avanzando, la dosis era modificada en función de los datos de peso y longitud, obtenidos en las biometrías que se realizaron a lo largo del año para comprobar la evolución de los peces. La duración total del experimento fue de 367 días. Para garantizar la buena condición de los medios de cultivo con sistema RAS, se medía diariamente la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y el pH del agua; comprobando que se mantuvieran dentro de niveles estables. A su vez, también eran medidos los niveles de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y fosfatos (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) para controlar los niveles de contaminación del medio. Para evitar la acumulación de estos compuestos en el medio, los acuarios con sistema de cultivo abierto (OFS) eran desagüados parcialmente dos veces al día, antes de alimentar a los peces, por medio de un grifo situado en la parte inferior cónica de los acuarios. Esta forma cónica permite la acumulación de las heces y la comida sobrante que precipitan en el fondo, que es donde se encuentra la boca de salida del grifo de desagüe, por lo que facilita en gran medida su eliminación. El flujo de agua en los acuarios con OFS era de 330 L/hora, por lo que el agua tardaba en renovarse por completo 3 horas. En los acuarios RAS de Kardala, el flujo de agua era de 45 L/minuto (2700 L/hora). Debido a que este sistema limpia el agua recirculante por medio de filtros, no era necesario realizar desagües periódicamente como en el caso del sistema OFS. Sin embargo, el agua perdida durante el proceso de recirculación era repuesta diariamente con agua fresca, y toda el agua del sistema recirculante era reemplazada cada 45 días.



Figura 2. Juveniles de *Chelon labrosus* en uno de los tanques con sistema OFS.

### Alimentación

En este experimento se emplearon dos tipos distintos de piensos comerciales, cada uno con un tipo de composición y energía digerible distintas: Pienso seco de tilapia (TI-3 Tilapia, Batch: 5502204), rico en carbohidratos y proteínas; y pienso de trucha (T-2 optiline 1P, Batch: 6225022), rico en proteínas y grasa. Ambos piensos fueron obtenidos de la empresa Skretting. (Nutreco Company, Burgos, España).

Tabla 1. Composición y energía digerible de los piensos empleados.

Pensos	Contenido						
	Proteína (%)	Grasa (%)	Carbohidratos (%)	Ceniza (%)	Celulosa (%)	P total (%)	Energía digerible (MJ/Kg)
Tilapia	35	6	~ 45	8	5	1.0	12.2
Trucha	44	21	~ 23.6	7.4	2.8	1.2	18.8

Debido a que el tamaño del pienso, en ambos casos, era demasiado grande para el estrecho esófago de estos peces, se procedió a su trituración por medio de una moladora de café. Una vez triturados, los piensos eran almacenados en cubos separados, cerrados y secos; evitando así la descomposición de los mismos. El alimento era tomado de los cubos por medio de recipientes

y pesado mediante una balanza de precisión, para suministrar la cantidad exacta de pienso establecida en función de la biomasa presente en cada tanque.

Los peces eran alimentados dos veces al día con la dosis correspondiente, exceptuando los fines de semana; por lo que se dividía en dos la cantidad total de cada pienso que debía ser aportada al día. A su vez, los tanques eran limpiados por medio de desaguados parciales, previos al suministro del alimento, con el objetivo de renovar el agua del sistema y aportar más oxígeno al mismo. De esta forma, el pienso era dosificado de forma más eficaz, facilitando un mayor aprovechamiento del alimento por parte de los individuos y permitiendo una mayor limpieza del medio, debido a la disminución del alimento no ingerido en la columna de agua, garantizando así unos niveles óptimos de oxígeno en los acuarios. Para futuros cálculos de aprovechamiento de energía y ratio de conversión de alimento, era llevado a cabo un seguimiento de los días en que se aportaba alimento a los tanques de ambos grupos experimentales, así como de la cantidad de pienso suministrada; mediante listas en las que se debía anotar el trabajo realizado en los acuarios cada día.

### Muestreo

Tanto los individuos de *C. labrosus* establecidos en acuarios OFS como los establecidos en acuarios RAS eran sometidos a biometrías, con el objetivo de observar su tasa de desarrollo y crecimiento. A lo largo del año se llevaron a cabo varias biometrías, de las cuales en este trabajo se han tomado datos de las siguientes 6, acontecidas en las fechas que se indican a continuación:

- T0: Realizada el 13/12/2018 para establecer las medidas iniciales de peso y longitud.
- T2: 21/03/2019
- T4: 10/07/2019
- T5: 02/10/2019
- T6: 18/12/2019

Para llevar a cabo estos muestreos se debía mantener en ayunas a los individuos, ya que el proceso genera estrés y un aumento del consumo de oxígeno, que se hubiese encontrado en muy baja concentración con la presencia de alimento en la columna de agua, pudiendo causar la muerte de los peces. En primer lugar, se liberaba agua de los acuarios para disminuir su nivel y poder capturar con mayor facilidad a los ejemplares. A continuación, por medio de una red de gran calibre, se tomaban aproximadamente 6 individuos y se depositaban en un recipiente con agua de mar, en el que previamente había sido diluida una concentración de anestésico (MS-222, 0,3g/L), adecuada para su manipulación. Una vez anestesiados, los peces eran medidos

con un ictiómetro con una precisión de 0,1 cm y seguidamente pesados con una balanza ajustada a las centésimas. Tras obtener los datos, los ejemplares eran depositados en un tanque de 600 litros con agua fresca, donde se recuperaban del proceso. Cada grupo experimental era medido por separado, de manera que, una vez finalizaba la medición de los mubles de uno de los grupos, estos eran devueltos del tanque de reposo al acuario correspondiente, el cual había sido rellenado de nuevo a su nivel de agua inicial. Todos los datos de longitud y peso tomados durante la biometría eran registrados en una hoja Excel para posteriores análisis estadísticos y comparativos.

Además, eran seleccionados al azar 10 individuos de cada grupo experimental (trucha y tilapia) para ser diseccionados. Las disecciones fueron realizadas en las fechas de muestreo anteriormente mencionadas, a excepción de T5 (02/10/2019). Previamente, todos los peces eran pesados y medidos, y se separaban según el tipo de pienso con el que habían sido alimentados. Durante la disección, era extraído en primer lugar el hígado, que era medido por medio de una balanza de precisión. A continuación, era tomada una porción del hígado que, junto con el bazo, el estómago, el intestino anterior, las branquias y músculo; eran introducidos en casetes etiquetados, indicando el pez al que pertenecían, el grupo experimental (trucha o tilapia) y el sistema de cultivo o lugar de procedencia (Plentzia o Kardala); así como su contenido. Estos casetes eran introducidos inmediatamente en botes con formalina tamponada al 4% para ser fijados. A las 24 horas, la formalina era sustituida por alcohol al 70%. Estas muestras eran procesadas por medio de un procesador de tejidos (Leica, ASP300S, nº serie 4333) y posteriormente incluidas en parafina por medio del equipo de inclusión (Leica, EG1150H, nº serie 8771).

Por otra parte, el resto del hígado, el intestino posterior y porciones representativas de músculo; eran introducidos en viales y almacenados en nitrógeno líquido, para posteriormente ser conservados en un congelador a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a la espera de ser empleados para los análisis histoquímicos.

Todos los procedimientos experimentales cumplieron con las Pautas de la Unión Europea (2010/63/UE) y la legislación española (RD53/2013 y ley 32/2007) para la manipulación y uso de animales de laboratorio bajo la supervisión y aceptación del comité de ética para experimentación y bienestar animal de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU), y de las autoridades provinciales (CEEAA M20-2018-133- Diputación de Bizkaia).

### Índices de rendimiento y salud

Por medio de los parámetros tomados en los muestreos, tanto de crecimiento como de alimento aportado, se realizaron una serie de índices para evaluar el rendimiento en términos de crecimiento de los especímenes, así como el estado de salud de los mismos:

$$\text{Ratio de conversión del alimento (FCR)} = \frac{\text{Cantidad de alimento}}{\text{Incremento de biomasa}}$$

$$\text{Tasa de crecimiento específico (SGR)} = \frac{[\log(\text{peso final}) - \log(\text{peso inicial})]}{\text{Duración del periodo (días)}} \times 100$$

$$\text{Ratio de eficiencia proteica (PER)} = \frac{\text{Incremento de biomasa}}{(\text{Cantidad total de proteína} \div \text{Número de individuos})}$$

$$\text{Factor de condición} = \frac{\text{Peso (g)}}{(\text{Longitud})^3 (\text{cm})^3} \times 100$$

$$\text{Índice hepato-somático (HSI)} = \frac{\text{Peso del hígado (g)}}{\text{Peso total del individuo (g)}} \times 100$$

### Análisis de datos

Con el objetivo de observar posibles diferencias en el crecimiento entre los grupos experimentales alimentados con pienso de tilapia y los alimentados con pienso de trucha, se realizaron T-tests de muestras independientes de las variables “Peso” y “Longitud” en función del pienso aportado (“Trucha” y “Tilapia”) para cada medición realizada (“T0”, “T2”, “T4”, “T5” y “T6”), en ambos sistemas de cultivo (OFS y RAS). Previamente a la realización del test paramétrico se aplicó a los datos un test de Levene, comprobando que siguiesen una distribución normal y que las varianzas fuesen homogéneas. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el uso del “software” IBM SPSS Statistics 25.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA).

Por otro lado, se realizó una regresión lineal con datos logarítmicos de la relación longitud – peso para los casos “Trucha OFS”, “Tilapia OFS”, “Trucha RAS” y “Tilapia RAS”. La relación longitud – peso de los especímenes está determinada por la Ley del cubo, cuya ecuación se describe como  $W = aL^b$  (Datta *et al.*, 2013; Froese, 2006), donde W es el peso en g y L la longitud en cm. Según la ecuación, para que un individuo mantenga su forma al crecer, el peso debe ser igual al cubo de la talla ( $b = 3$ ), por lo que el crecimiento sería isométrico. En cambio, si  $b > 3$  los individuos incrementan más su peso en relación a su talla, presentando crecimiento alométrico positivo; mientras que, si  $b < 3$  los individuos experimentan un mayor incremento de su longitud respecto a su peso, presentando un crecimiento alométrico negativo. Para hallar



el valor  $b$ , se transformó logarítmicamente la ecuación anterior, obteniendo la función de la recta del análisis de regresión lineal para cada caso,  $\text{Log } W = \log a + b \log L$ ; donde  $W$  es el peso en g,  $L$  es la longitud en cm, “ $a$ ” es la intersección de la regresión y “ $b$ ” es la pendiente de la recta. El análisis de regresión lineal se llevó a cabo realizando diagramas de dispersión de longitud y peso para cada caso, empleando la plataforma Excel.

### Histología

Las muestras tomadas en la disección destinadas a la histología se almacenaron en tres casetes por pez, albergando parte del hígado y el bazo completo, el estómago y el intestino anterior, y las branquias y músculo respectivamente. Dichos casetes, una vez fijados en formalina durante 24 horas y seguidamente introducidos en alcohol al 70%, debían ser procesados por medio de un procesador de tejidos automático (Leica, ASP300S, nº serie 4333), en el cual las muestras eran sometidas a distintas graduaciones de etanol y lavados en xileno. Acto seguido, los tejidos eran introducidos en un baño de parafina, e incluidos dentro de moldes mediante un equipo de inclusión de parafina (Leica, EG1150H, nº serie 8771). La parte inferior de los respectivos casetes, en la que figuraban las etiquetas de contenido y procedencia, era colocada encima de los moldes a modo de base y estos se dejaban en reposo hasta secarse. De esta manera, los tejidos incluidos en parafina se encontraban etiquetados y listos para ser cortados.

Debido a las circunstancias acontecidas en los últimos meses, que limitaron en gran medida el tiempo disponible, se decidió realizar únicamente cortes histológicos de hígado e intestino obtenidos en la última disección (T6), realizada el 18 de diciembre de 2019. Siendo así, se llevaron a cabo cortes de muestras de ambos tejidos, obtenidas de 10 individuos alimentados con pienso de trucha y de 10 individuos alimentados con pienso de tilapia, tanto de las instalaciones de Plentzia (OFS) como de las de Kardala (RAS), es decir, un total de 80 muestras. Los cortes histológicos se realizaron mediante un microtomo Leica RM2125RTS, con un grosor de 5 micras. Se realizaron tres replicas por muestra, previniendo posibles fallos en el proceso de corte o la destrucción de las preparaciones, cada una de las cuales presentaba tres cortes por porta. Los portaobjetos con el tejido ya cortado, eran depositados en bandejas y secados en una incubadora a 37 °C. Una vez secas, las preparaciones (una por muestra) eran teñidas con hematoxilina – eosina por medio de un teñidor automático (Leica XL (ST 5010), nº serie 3172) y seguidamente montadas mediante un montador de portas automático (Leica, CV5030, nº serie 3561) acoplado a la máquina anterior, de manera que una vez finalizaba la tinción, la máquina enlazaba el siguiente paso con este dispositivo, que colocaba los cubreobjetos sobre las preparaciones.

Dichas preparaciones, fueron observadas por medio de un microscopio óptico de alta definición (Olympus BX61) con una cámara acoplada (Olympus DP74) para tomar imágenes de las preparaciones. Esta cámara era manejada por medio de un sistema informático (cellSens), desde el cual se daba el enfoque y formato óptimos a la zona que se deseaba fotografiar del tejido. Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en un disco duro para su posterior estudio.

#### Detección de lípidos neutros

Con el objetivo de observar los efectos de ambos tipos de alimento en el tracto digestivo, y comprobar las diferencias a la hora de digerir cada tipo de pienso, se tomaron las muestras congeladas de intestino posterior para observar la presencia de lípidos neutros en el tejido. Para ello, se tomaron las muestras del congelador trasladándolas rápidamente a un criostato (Leica Instruments GmbH, Germany), con la cabina programada a  $-26^{\circ}\text{C}$ , en el cual se realizaron cortes de 10 micras del intestino. Los cortes en frío eran adheridos a los portaobjetos debido a la diferencia de temperatura. Cada portaobjeto albergaba 5 cortes de muestras distintas de su mismo grupo experimental. Estas preparaciones eran recopiladas en gradillas y almacenadas en un congelador a  $-40^{\circ}\text{C}$ , a la espera de ser teñidas. La identificación de los lípidos neutros se realizó histoquímicamente por medio de la tinción *oil red O*, según describió Culling en 1974. Para ello, en primer lugar, las preparaciones fueron introducidas en una cubeta Hellendahl para tinciones y fijadas durante 15 minutos con una solución *Baker* ( $\pm 2.5\%$  NaCl). A continuación, fueron secadas a temperatura ambiente y, seguidamente, lavadas con isopropanol al 60 % y bañadas en la tinción ORO durante 20 minutos. Dicha tinción resultaba del proceso de elaborar una disolución *stock* de ORO (Sigma, O0625) en isopropanol saturada al 0,3 %, de la que se tomaban 60 mL para ser diluidos en 40 mL de agua destilada. Tras 10 minutos de mezclado para estabilizar la disolución, esta era filtrada en un vaso de precipitados por medio de un papel de filtro, dando lugar a la disolución de tinción, cuyo efecto era viable durante 2 horas tras su elaboración. Una vez teñidas, las preparaciones eran diferenciadas en isopropanol al 60 % y sumergidas durante 20 minutos en otra cubeta Hellendahl con Fast Green FCF al 1 % (Sigma, F-7252). Una vez finalizado este paso, las preparaciones eran lavadas en agua y montadas en un medio acuoso por medio de gelatina glicerinada de Kaiser. Los portaobjetos con el tejido se dejaban secar y posteriormente eran observados al microscopio (Olympus BX61) para comprobar los resultados, tomando imágenes de las zonas más representativas.

## Resultados

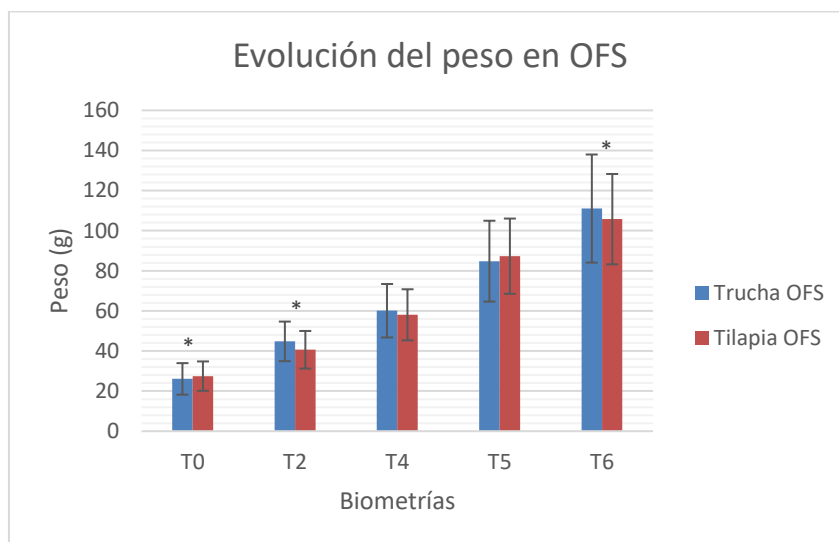
Tras 367 días de cultivo de *Chelon labrosus* en acuarios OFS y RAS, alimentados con pienso comercial de tilapia y pienso de trucha, se observó una mortalidad relativamente baja. En todo el año, se produjo la muerte de 5 a 8 individuos en cada grupo experimental, la mayoría de casos debidos a saltos de ejemplares fuera de los acuarios; exceptuando al grupo alimentado con pienso de trucha y cultivado en OFS, que presentó una mortalidad de 26 individuos en el mes de septiembre. Esta mortalidad, tan marcada y localizada en el tiempo, fue debida a un fallo producido durante las labores de mantenimiento de los acuarios OFS, ya que la llave de flujo de agua quedó cerrada, provocando anoxia en el medio y la consiguiente muerte de los ejemplares. Este suceso no influyó negativamente al resto de individuos del cultivo, ya que su rendimiento en términos de aprovechamiento del alimento continuó siendo óptimo cuando el medio recuperó los niveles de oxígeno iniciales. Además, se obtuvieron los siguientes resultados a partir de datos obtenidos de biometrías (T0, T1, T2, T4, T5 y T6) y métodos histológicos e histoquímicos.

### Desarrollo del crecimiento (Peso – Longitud)

El crecimiento de los especímenes fue determinado a partir de los datos de peso (g) y longitud (cm) de cada individuo, realizando el promedio de ambas variables en cada periodo del cultivo (T0, T1, T2, T4, T5, T6) para cada grupo experimental. Por un lado, la Gráfica 1 representa la evolución del peso en ambos grupos experimentales (trucha y tilapia) en los cultivos OFS, mientras que la Gráfica 2 muestra la evolución de la misma variable en ambos grupos experimentales en los cultivos RAS. Por otro lado, las Gráficas 3 y 4 recogen la evolución de la longitud de los peces de ambos grupos experimentales en los cultivos OFS y RAS, respectivamente. Además, las Tablas 2 y 3 indican el incremento de biomasa de los grupos experimentales producido entre las mediciones, en los dos sistemas de cultivo.

Al analizar la Gráfica 1, se observa un incremento del peso relativamente uniforme entre los periodos T0 y T4 para ambas alimentaciones, aunque con diferencias significativas en T0 y T2 ( $0,042 \leq 0,05$  y  $0 \leq 0,05$ ). A partir de T4 se observa un ligero repunte en las siguientes mediciones, presentando tanto T5 como T6 diferencias significativas en cuanto al tipo de pienso aportado ( $0,025 \leq 0,05$  y  $0,046 \leq 0,05$ ), dando lugar a un peso medio final en el grupo alimentado con pienso de trucha de  $111,03 \text{ g} \pm 26,96$  y un peso medio final de  $105,74 \text{ g} \pm 22,54$  en el grupo alimentado con pienso de tilapia. Sin embargo, a pesar de obtener un mayor peso final los individuos alimentados con pienso de trucha, si se observa la Tabla 2 se puede

comprobar que el incremento de biomasa del grupo alimentado con pienso de tilapia es superior en los periodos T2 – T4 y T4 – T5, lo que demuestra un mejor rendimiento alimenticio a lo largo del año. Además, las barras de desviación de la Gráfica 1 muestran una mayor dispersión en T6 para el grupo alimentado con pienso de trucha, lo que indica una menor uniformidad entre los pesos finales de los individuos de este grupo.



Gráfica1. Evolución del peso de los grupos experimentales alimentados con pienso de tilapia y pienso de trucha en OFS. (\*) indica diferencias significativas en el peso entre los dos grupos experimentales en función del tipo de pienso aportado en una medición concreta. Las barras en cada columna indican la desviación estándar.

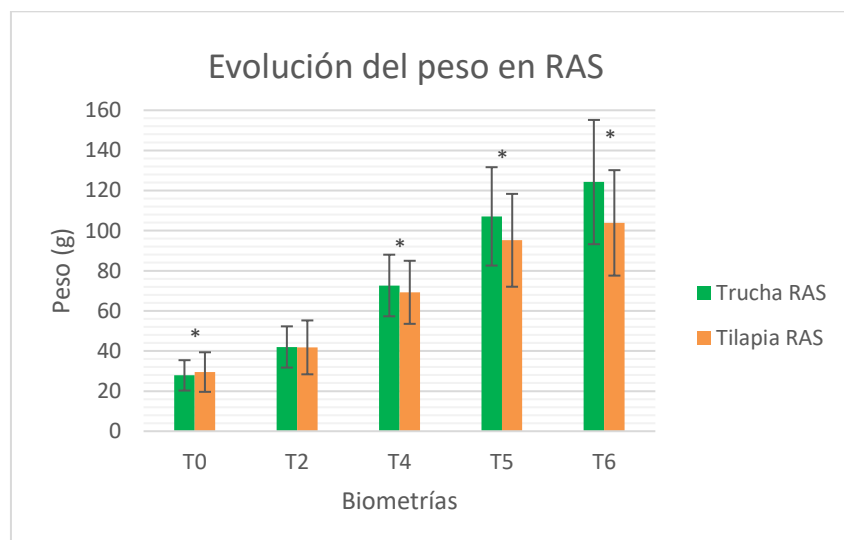
Tabla 2. Incremento de biomasa en función del peso en cada periodo de cultivo de los grupos experimentales (trucha y tilapia) cultivados en OFS.

Incremento de biomasa (g) OFS		
Periodo	Trucha	Tilapia
T0 - T2	18,72	13,14
T2 - T4	15,28	17,43
T4 - T5	24,71	29,24
T5 - T6	26,24	18,46

Nota. OFS: Open Flow system. Valores en gramos del incremento de biomasa, calculados realizando la diferencia de las medias de peso entre una medición y la siguiente.

Por otro lado, se observa una evolución uniforme del peso de los peces cultivados en RAS (Gráfica 2) entre las temporadas T0 y T2, con una ligera desviación mayor en los muebles alimentados con el pienso de tilapia. En las siguientes mediciones, los individuos alimentados

con pienso de trucha muestran un incremento del peso mayor en comparación con los individuos alimentados con pienso de tilapia (significación de  $(0,016; 0; 0) \leq 0,05$  para T4, T5 y T6 respectivamente), alcanzando un peso medio final de  $124,22 \text{ g} \pm 30,97$  frente a  $103,86 \text{ g} \pm 26,28$ . Esta diferencia tan evidente entre los pesos finales, mucho más marcada que en los grupos experimentales cultivados en OFS (Gráfica 1), se justifica en la Tabla 3, donde se puede observar que el incremento de biomasa de los individuos alimentados con pienso de trucha en los cultivos RAS es mayor entre temporadas en comparación con el grupo alimentado con pienso de tilapia, dándose a entender un mejor rendimiento alimenticio del primer grupo. Además, el incremento de biomasa del grupo alimentado con pienso de trucha experimenta una tendencia ascendente hasta el periodo T5 – T6, en el que se da un descenso considerable de 34,46 g a 17, 11 g de incremento de biomasa. Mientras que, en el grupo alimentado con pienso de tilapia, el valor más alto de incremento de biomasa se da en el periodo T2 – T4, con un valor de 27, 44 g, a partir del cual se observa un descenso de este parámetro hasta alcanzar un valor de 8,68 g en el periodo T5 – T6, que difiere en gran medida con el otro grupo experimental alimentado con pienso de trucha, cuyo valor de incremento de biomasa en este periodo es de 17, 11 g. Cabe destacar que la barra de desviación en T6 para el grupo alimentado con pienso de trucha es algo mayor que la del otro grupo experimental, lo que indicaría una mayor variación en la distribución del peso entre los individuos de este grupo.



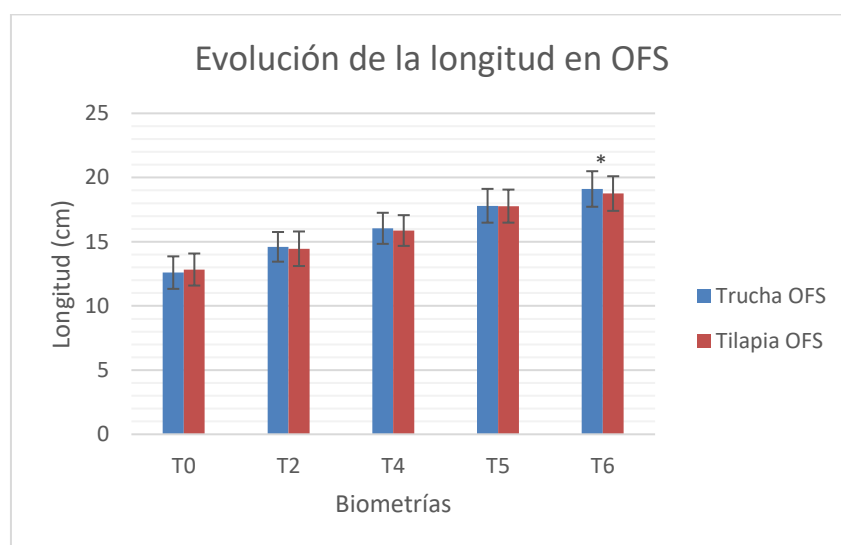
Gráfica 2. Evolución del peso de los grupos experimentales alimentados con pienso de tilapia y pienso de trucha en RAS. (\*) indica diferencias significativas en el peso entre los dos grupos experimentales en función del tipo de pienso aportado en una medición concreta. Las barras en cada columna indican la desviación estándar.

Tabla 3. Incremento de biomasa en función del peso en cada periodo de cultivo de los grupos experimentales (trucha y tilapia) cultivados en RAS.

Incremento de biomasa (g) RAS		
Periodo	Trucha	Tilapia
T0 - T2	14,18	12,31
T2 - T4	30,63	27,44
T4 - T5	34,46	25,94
T5 - T6	17,11	8,68

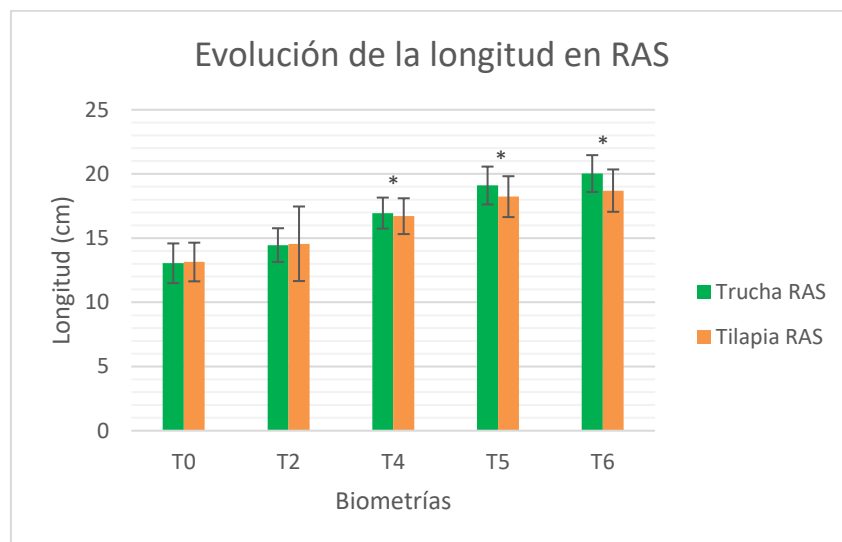
Nota. RAS: Recirculatory aquaculture system. Valores en gramos del incremento de biomasa, calculados realizando la diferencia de las medias de peso entre una medición y la siguiente.

En cuanto a la longitud, la Gráfica 3 muestra un aumento uniforme y similar en ambos grupos experimentales cultivados en OFS durante todo el año, si acaso los individuos alimentados con pienso de trucha presentan una longitud media final de 19,11 cm  $\pm$  1,38, ligeramente mayor que el grupo alimentado con pienso de tilapia, con una longitud final de 18,75 cm  $\pm$  1,35. Cabe destacar que estadísticamente se observan diferencias significativas entre los individuos alimentados con pienso de tilapia y los alimentados con pienso de trucha en el tiempo T6 ( $0,014 \leq 0,05$ ). La gráfica muestra unas barras de desviación de muy pequeño rango y similares entre ambos grupos experimentales, lo que indica que los individuos de cada grupo, por separado, presentan longitudes relativamente homogéneas.



Gráfica 3. Evolución de la longitud de los grupos experimentales alimentados con pienso de trucha y pienso de tilapia cultivados en OFS. (\*) indica diferencias significativas en la talla entre los grupos experimentales (trucha y tilapia) para un tiempo determinado. Las barras en cada columna indican la desviación estándar.

Por otra parte, se observa que la evolución de la longitud de los peces cultivados en RAS (Gráfica 4) es uniforme y no presenta diferencias significativas entre ambos grupos durante las temporadas T0, T2; pudiéndose destacar en T2 un rango más amplio en la barra de desviación estándar del grupo alimentado con tilapia, indicando una mayor heterogeneidad entre las longitudes observadas en los individuos de este grupo. Durante los periodos T4, T5 y T6 el incremento de la longitud conserva su uniformidad respecto al total, aunque con una predominancia del grupo alimentado con pienso de trucha, sobre todo en T5 y T6; alcanzando una longitud media final de 20,03 cm  $\pm$  1,43 en comparación con el grupo alimentado con pienso de tilapia, con una longitud media final de 18,70 cm  $\pm$  1,65. Los tres tiempos presentan diferencias significativas entre los grupos experimentales de tilapia y trucha ((0,041; 0; 0)  $\leq$  0,05).



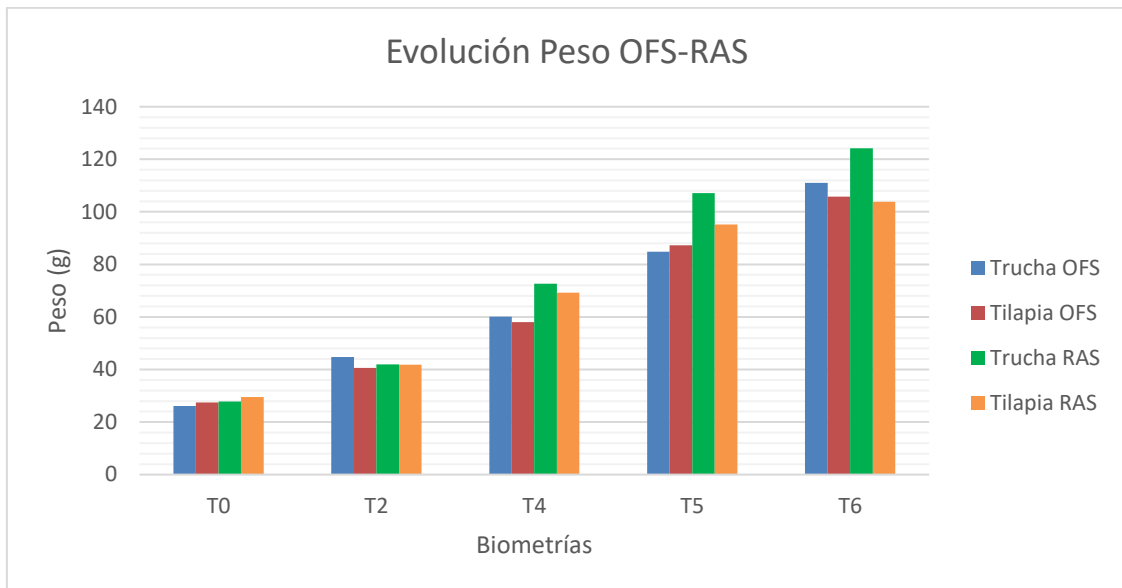
Gráfica 4. Evolución de la longitud de los grupos experimentales alimentados con pienso de trucha y pienso de tilapia cultivados en RAS. (\*) indica diferencias significativas en la talla entre los grupos experimentales (trucha y tilapia) para un tiempo determinado. Las barras en cada columna indican la desviación estándar.

### Comparación de los sistemas OFS y RAS respecto a la longitud y el peso

En este apartado se realiza una síntesis de los resultados anteriormente mostrados para observar las diferencias entre los dos tipos de sistema de cultivo empleados (OFS y RAS).

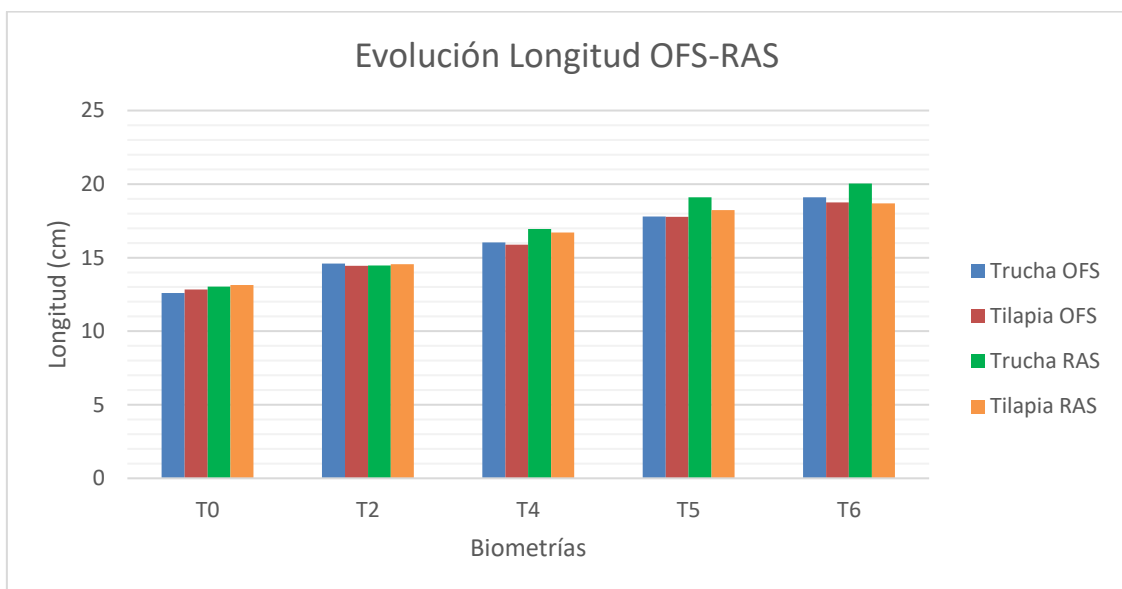
En primer lugar, la Gráfica 5 muestra las diferencias respecto a la evolución del peso entre los cultivos OFS y RAS, pudiendo observarse el predominio del grupo experimental alimentado con pienso de trucha y cultivado en RAS respecto al resto, a partir de la medición T4. Cabe destacar también esta superioridad, en menor medida, respecto a los grupos cultivados en OFS a partir de T4, en el grupo experimental alimentado con tilapia y cultivado en RAS; aunque en

la temporada T5 este grupo se ve superado en el peso por ambos grupos experimentales cultivados en OFS.



Gráfica 5. Comparación de OFS y RAS en función de la evolución del peso en los distintos grupos experimentales.

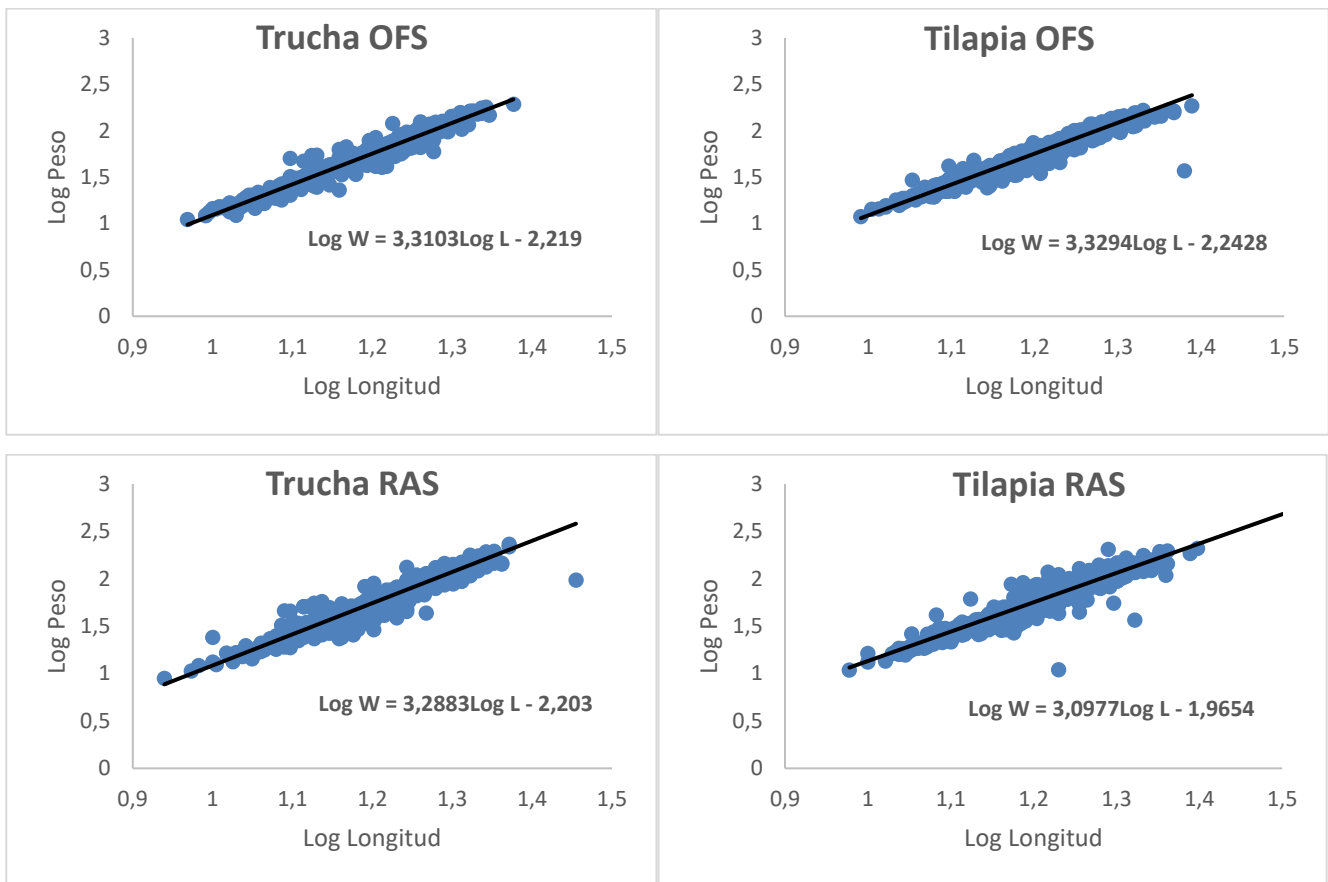
En cuanto a la longitud, la Gráfica 6 muestra una evolución de este parámetro bastante similar entre ambos tipos de sistemas, si acaso el grupo alimentado con pienso de trucha y cultivado en RAS obtiene una longitud final ligeramente mayor respecto al resto de grupos experimentales.



Gráfica 6. Comparación de OFS y RAS en función de la evolución de la longitud en los distintos grupos experimentales.



## Relación Longitud – Peso



Gráficas 7, 8, 9 y 10. Relación logarítmica Longitud – Peso de los mubles alimentados con pienso de trucha y de tilapia en OFS y RAS durante 367 días.

El crecimiento fue alométrico positivo en todos los casos, a excepción del cultivo alimentado con pienso de Tilapia en sistema RAS (Gráfica 10), que presentó mayor tendencia al crecimiento isométrico.

### Índices de rendimiento nutricional

Para determinar el rendimiento del tipo de pienso empleado en función del desarrollo de los individuos se emplearon la tasa de crecimiento específico (SGR), la ratio de conversión del alimento (FCR) y la ratio de eficiencia proteica (PER), cuyos datos se encuentran recogidos en las Tablas 4 y 5, para OFS y RAS, respectivamente.

Según los resultados obtenidos, el aprovechamiento proteico (PER) a lo largo del año es mayor en los individuos cultivados en OFS, observándose una mayor eficiencia proteica en los individuos alimentados con pienso de tilapia (valor medio de  $0,68 \pm 0,17$ ) (Tabla 4). Por otro lado, la tasa de crecimiento específico es superior en los individuos alimentados con pienso de trucha en ambos sistemas de cultivo (OFS y RAS). En cuanto al factor de conversión del

alimento (FCR), los cultivos RAS muestran unos valores muy superiores en la última medición en comparación con los OFS, siendo el grupo experimental alimentado con pienso de tilapia quien presenta una media anual más alta, con un valor de  $7,70 \pm 5,22$  (Tabla 5).

Tabla 4. Valores de los índices de tasa de crecimiento específico (SGR), ratio de conversión del alimento (FCR) y ratio de eficiencia proteica (PER) en cada periodo y valor medio anual de cada índice con su desviación estándar para los grupos experimentales (trucha y tilapia) cultivados en OFS.

OFS						
Periodo	Trucha			Tilapia		
	SGR	FCR	PER	SGR	FCR	PER
T0 - T2	0,56	2,95	0,77	0,41	4,08	0,70
T2 - T4	0,26	6,47	0,35	0,32	5,45	0,52
T4 - T5	0,42	3,83	0,59	0,44	3,16	0,90
T5 - T6	0,35	3,88	0,59	0,29	4,98	0,57
Promedio	<b>0,40±0,13</b>	<b>4,28±1,52</b>	<b>0,58±0,71</b>	<b>0,36±0,77</b>	<b>4,42±1,01</b>	<b>0,68±0,17</b>

Nota. OFS: Open Flow system. SGR: Specific growth rate. FCR: Food conversion ratio. PER: Proteic efficiency ratio. Valores en negrita representan los valores medios de los índices calculados en cada periodo del experimento, con sus respectivas desviaciones estándar.

Tabla 5. Valores de los índices de tasa de crecimiento específico (SGR), ratio de conversión del alimento (FCR) y ratio de eficiencia proteica (PER) en cada periodo y valor medio anual de cada índice con su desviación estándar para los grupos experimentales (trucha y tilapia) cultivados en RAS.

RAS						
Periodo	Trucha			Tilapia		
	SGR	FCR	PER	SGR	FCR	PER
T0 - T2	0,45	5,17	0,44	0,38	6,27	0,46
T2 - T4	0,52	3,57	0,64	0,48	3,98	0,72
T4 - T5	0,42	4,19	0,54	0,35	5,14	0,56
T5 - T6	0,19	7,96	0,29	0,11	15,41	0,19
Promedio	<b>0,40±0,14</b>	<b>5,22±1,94</b>	<b>0,48±0,15</b>	<b>0,33±0,16</b>	<b>7,70±5,22</b>	<b>0,48±0,22</b>

Nota. RAS: Recirculatory Aquaculture System. SGR: Specific growth rate. FCR: Food conversion ratio. PER: Proteic efficiency ratio. Valores en negrita representan los valores medios de los índices calculados en cada periodo del experimento, con sus respectivas desviaciones estándar.

### Índices de salud

Todos los grupos experimentales presentan valores para el factor de condición superiores a uno a lo largo del año (Tabla 6), lo que indica un buen estado de salud de los peces respecto a las condiciones del medio y al tipo de alimentación. Los valores obtenidos en la última medición son bastante similares, siendo todos próximos a 1,60.

Tabla 6. Valores del factor de condición de los grupos experimentales (trucha y tilapia) de ambos sistemas de cultivo (OFS y RAS) en cada medición.

Factor de condición				
Medición	OFS		RAS	
	Trucha	Tilapia	Trucha	Tilapia
T0	1,30	1,30	1,26	1,30
T2	1,44	1,34	1,39	1,35
T4	1,45	1,45	1,49	1,48
T5	1,50	1,55	1,54	1,57
T6	<b>1,59</b>	<b>1,60</b>	<b>1,55</b>	<b>1,59</b>

Nota. OFS: Open Flow system. RAS: Recirculatory Aquaculture System. Valores en negrita indican el valor del índice de condición en el momento final del experimento para cada grupo experimental.

En cuanto al índice hepato-somático (Tabla 7), los individuos alimentados con pienso de tilapia en ambos sistemas de cultivo (OFS y RAS) muestran, en términos generales, valores medios superiores, siendo más evidente en el sistema OFS.

Tabla 7. Valores medios de índice hepato-somático (HSI) obtenidos en cada disección de los grupos experimentales (trucha y tilapia) de ambos sistemas de cultivo (OFS y RAS). Se muestran las desviaciones estándar de los valores medios de cada disección y del promedio anual de cada grupo experimental.

Índice hepato-somático				
Disección	OFS		RAS	
	Trucha	Tilapia	Trucha	Tilapia
T0	2,61±0,47	2,61±0,47	2,49±0,46	2,49±0,46
T2	1,98±0,54	2,87±1,07	2,26±0,43	2,64±0,53
T4	1,89±0,20	2,35±0,60	1,93±0,53	1,78±0,44
T6	1,07±0,13	1,36±0,24	1,04±0,27	1,09±0,18
Promedio	<b>1,89±0,63</b>	<b>2,30±0,66</b>	<b>1,93±0,64</b>	<b>2,00±0,71</b>

Nota. OFS: Open Flow system. RAS: Recirculatory Aquaculture System. Valores en negrita representan las medias de los valores medios de índice hepato-somático obtenidos en cada disección, con sus desviaciones estándar.

### Análisis histológico e histoquímico de muestras de tejido de hígado e intestino

Las muestras de tejido analizadas pertenecen a muestras de hígado e intestino de los grupos alimentados con pienso de trucha y de tilapia en ambos sistemas de cultivo, obtenidas en la disección T6, es decir, del último muestreo que se realizó en este estudio.

Las muestras de hígado no muestran diferencias significativas entre los dos tipos de alimentación ni entre los sistemas de cultivo. El tejido hepático presenta porciones de tejido

con un nivel alto de vacuolización en los dos grupos experimentales y en ambos sistemas de cultivo, atribuido a una acumulación de lípidos en el hígado, en comparación a una muestra de hígado control procedente de un muble salvaje. El nivel de vacuolización de los hepatocitos varía entre individuos, indistintamente del alimento aportado.

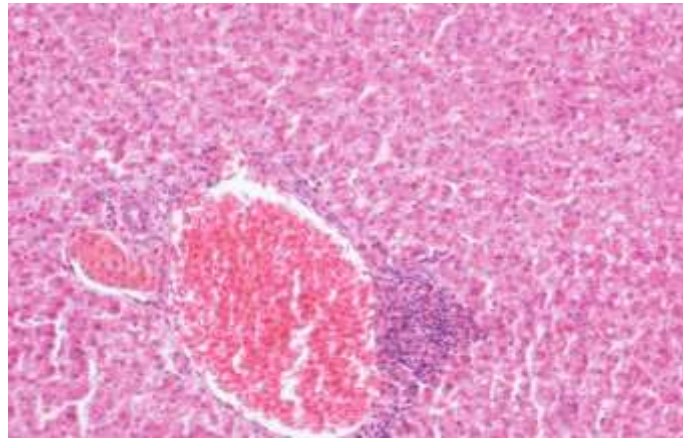


Figura 3. Tejido hepático de individuo de *C. labrosus* salvaje. (Foto obtenida de la base de datos del banco de muestras del PiE).

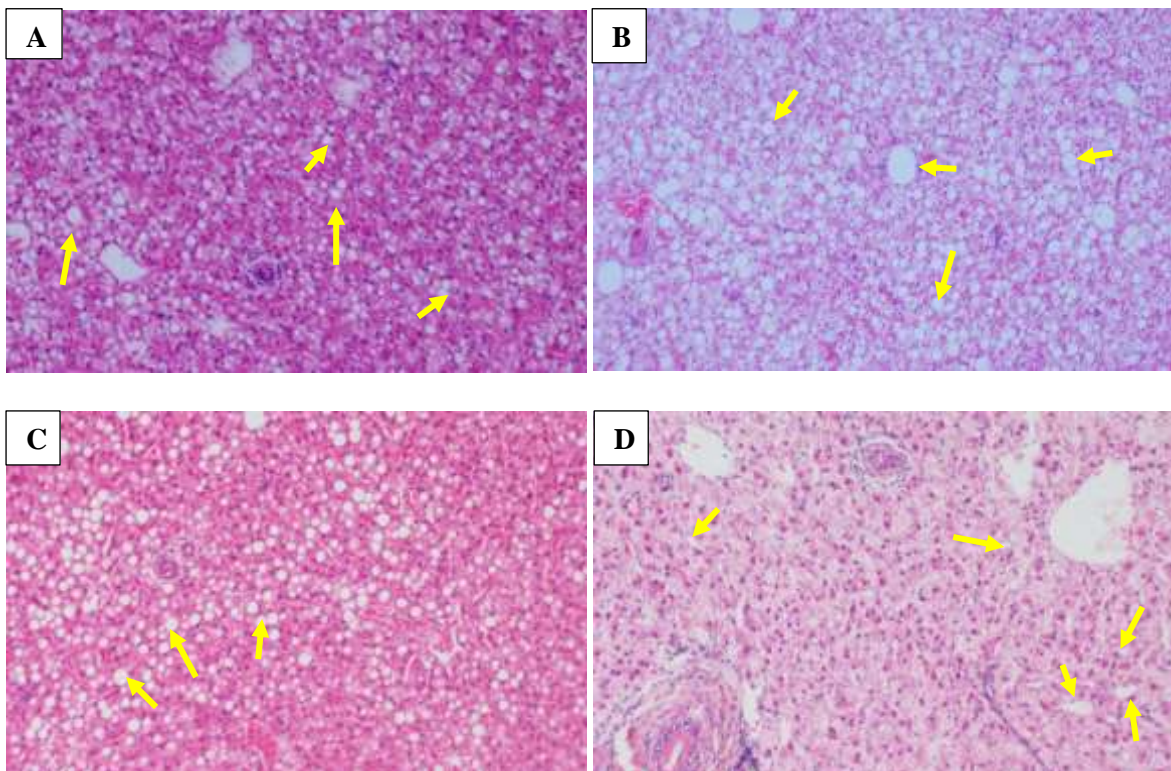
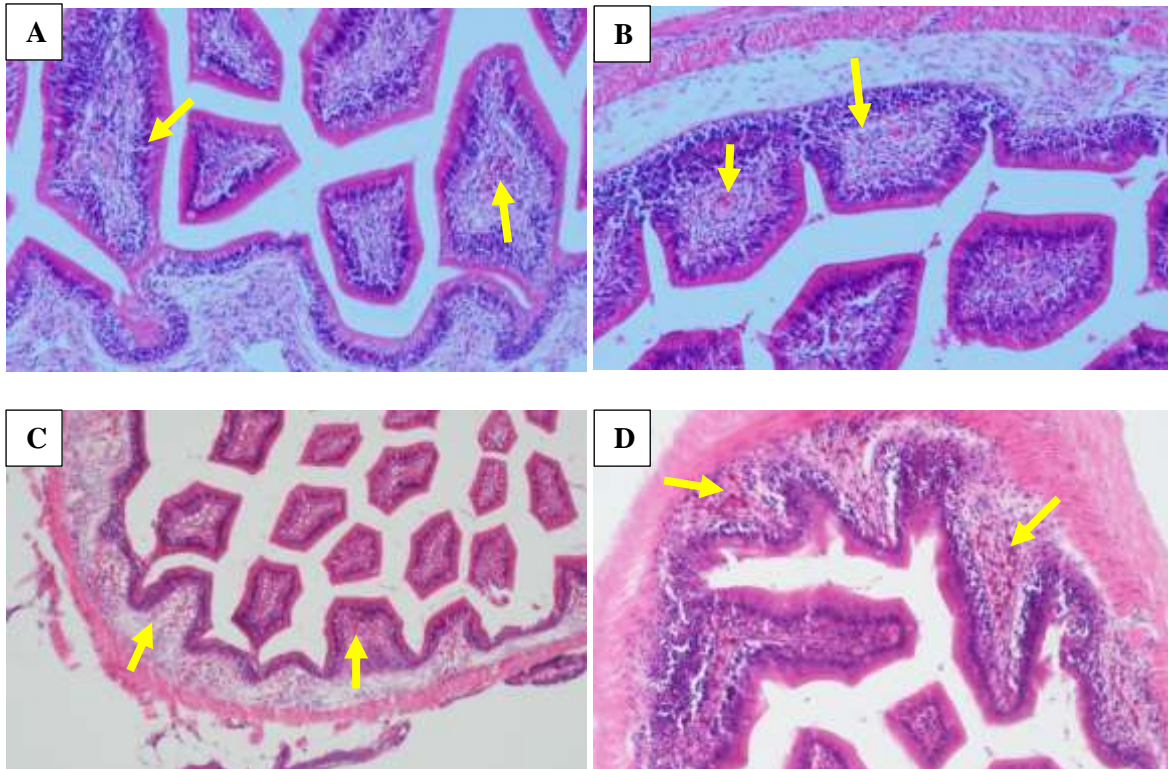


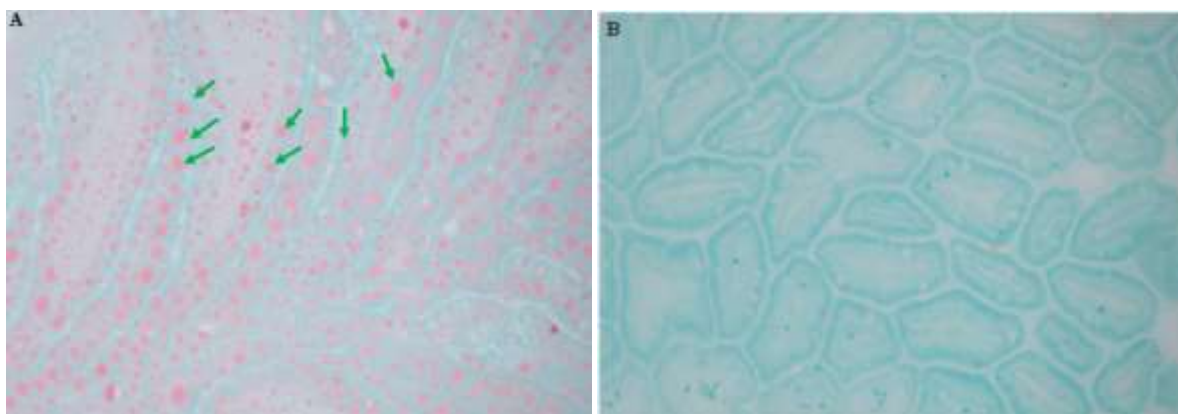
Figura 4. Muestras de hígado de *C. labrosus* de todos los grupos experimentales en ambos sistemas de cultivo (OFS y RAS), teñidas con hematoxilina-eosina. (A) Muestra de hígado de muble alimentado con pienso de trucha y cultivado en OFS. (B) Muestra de hígado de muble alimentado con pienso de tilapia y cultivado en OFS. (C) Muestra de hígado de muble alimentado con pienso de trucha y cultivado en RAS. (D) Muestra de hígado de muble alimentado con pienso de tilapia y cultivado en RAS. Las flechas amarillas indican vacuolas de grasa en los hepatocitos, presentes en la mayor parte del tejido.

En cuanto a las muestras de tejido de intestino, no se encuentran diferencias marcables entre los individuos alimentados con pienso de tilapia y los alimentados con pienso de trucha, ni entre los tipos de sistema de cultivo. Sin embargo, durante las disecciones realizadas pudo observarse una gran acumulación de grasas periviscerales en los mubles alimentados con pienso de trucha en ambos sistemas de cultivo, en comparación con los mubles alimentados con pienso de tilapia. Cabe mencionar la presencia moderada de células granulares eosinofílicas en puntos específicos de las vellosidades del tejido intestinal, observadas en ambos grupos experimentales.



Figuras 5. Muestras de intestino de *C. labrosus* de todos los grupos experimentales en ambos sistemas de cultivo (OFS y RAS), teñidas con hematoxilina-eosina. (A) Muestra de intestino de muble alimentado con pienso de trucha y cultivado en OFS. (B) Muestra de intestino de muble alimentado con pienso de tilapia y cultivado en OFS. (C) Muestra de intestino de muble alimentado con pienso de trucha y cultivado en RAS. (D) Muestra de intestino de muble alimentado con pienso de tilapia y cultivado en RAS. Las flechas amarillas indican infiltraciones de células granulares eosinofílicas en la lámina propia.

Por otra parte, las muestras de intestino teñidas con ORO para detectar lípidos neutros presentan diferencias según el tipo de alimentación, pudiendo observarse una mayor concentración de lípidos neutros en los tejidos procedente de individuos alimentados con pienso de trucha.



Figuras 6. Muestras de intestino teñidas con tinción ORO para la detección de lípidos neutros. (A) Intestino de *C. labrosus* alimentado con pienso de trucha. Las flechas verdes indican vacuolas de lípidos neutros en los enterocitos, presentes en todo el tejido. (B) Intestino de *C. labrosus* alimentado con pienso de tilapia.

## Discusión

La realización de este estudio ha permitido recopilar datos sobre los efectos de dos piensos comerciales, con proporciones de carbohidratos, proteínas y grasas diferentes, así como con distinto nivel de energía digerible; en el crecimiento y estado de salud de la especie *C. labrosus* en dos tipos de sistema de cultivo intensivo (OFS – RAS); de cara a formular, en futuros estudios, una dieta eficiente, saludable y sostenible que sea ideal para la producción de este pez en acuicultura.

La mortalidad observada a lo largo del año en los distintos grupos experimentales en ambos sistemas de cultivo fue generalmente baja, a excepción del grupo alimentado con pienso de trucha y cultivado en OFS, que presentó 26 individuos muertos en el mes de septiembre de 2019. Sin embargo, esta mortalidad fue causada por un fallo en las labores de mantenimiento de los acuarios, en las que la llave de flujo de agua del acuario correspondiente al grupo alimentado con pienso de trucha quedó cerrada, provocando cierto grado de anoxia en el medio; por lo que se trató de un caso puntual y accidental, confirmando que las condiciones generales del medio eran óptimas para el cultivo de los ejemplares. Además, una vez retornaron los niveles óptimos de oxígeno al medio, los individuos mostraron una recuperación rápida, por lo que este suceso no causó otras repercusiones negativas en los ejemplares alimentados con pienso de trucha y cultivados en OFS.

Según los datos recopilados sobre el factor de condición a lo largo del año, todos los grupos experimentales en ambos sistemas de cultivo presentan valores superiores a 1 y bastante similares entre sí, que además aumentan entre temporadas paralelamente al crecimiento de los individuos, reflejando el buen estado general de los peces y confirmando unas condiciones adecuadas del medio, así como una relativamente buena calidad nutricional (Sogbesan *et al.*,

2017). Sin embargo, el análisis histológico realizado muestra parámetros, como la vacuolización en el tejido hepático o la acumulación de lípidos neutros en el intestino, que demuestran que ambas dietas pueden tener ciertos efectos negativos sobre la salud de los individuos, siendo posible barajar ciertos ajustes en su formulación de cara a una alimentación más ajustada a los requerimientos de la especie de estudio. Además, los datos sobre el incremento en peso y longitud guardan diferencias dependiendo del tipo de dieta y sistema de cultivo empleados, que no pueden ser detectados por el factor de condición, por lo que se deben tener en consideración otros parámetros para determinar, de forma más concreta, el estado de salud de los peces. Uno de esos parámetros a tener en cuenta, es la relación logarítmica entre la longitud y el peso, que determina el tipo de crecimiento del animal en función de si el peso aumenta en mayor proporción que la talla ( $b > 3$ ), o por el contrario es la longitud la que experimenta un mayor incremento respecto al peso ( $b < 3$ ); donde el valor “b” representa la pendiente de regresión (Cifuentes *et al.*, 2012). Los valores de “b” obtenidos para los grupos experimentales alimentados con pienso de trucha en ambos sistemas (OFS y RAS) fueron de 3,31 y 3,29 respectivamente, que junto con el grupo alimentado con pienso de tilapia y cultivado en OFS, con un valor de 3,33, presentaron un mayor incremento del peso respecto a la talla. Los mubles alimentados con pienso de tilapia y cultivados en RAS presentaron, sin embargo, un crecimiento más proporcional en cuanto a la relación longitud – peso ( $b = 3$ ), con un valor de  $b = 3,09$ . Por otra parte, según ciertos autores, se consideran individuos de crecimiento isométrico a aquellos que fluctúan dentro de los valores  $b = 2,5$  y  $b = 3,5$  (Carlander, 1969; Froese, 2006), por lo que todos los grupos experimentales presentarían este tipo de crecimiento, conservando relativamente su forma durante su desarrollo. Pese a ello, los mubles alimentados con pienso de trucha en ambos sistemas de cultivo, según indicaron sus valores “b”, aumentaron su peso en mayor medida que su longitud, presentando grandes cantidades de grasa depositada en los órganos viscerales en las últimas disecciones realizadas. Como se ha documentado frecuentemente en la bibliografía (Yan *et al.*, 2015), este hecho se debe a la composición del pienso de trucha, que posee un alto porcentaje de grasas (21 %), provocando que los mubles se encuentren en un estado de obesidad poco saludable. Considerando este dato, los individuos alimentados con pienso de tilapia, que también presentan un buen aumento del peso en relación a la longitud sin presentar tanta acumulación perivisceral de grasas y, por tanto, un mejor estado de salud; serían más atractivos para los consumidores de cara a aumentar el valor de mercado de este producto.

Previamente a discutir sobre los efectos de los dos piensos en el incremento del peso y la longitud de los distintos grupos experimentales en función de su rendimiento, en términos de eficiencia y aprovechamiento nutricional, se deben tener en cuenta dos factores de confusión que pudieron influir de forma directa a la hora de discutir los resultados de este estudio. Por un lado, como se comentó previamente, en las instalaciones del PiE, en Plentzia, donde se realizaron los cultivos OFS; el intercambiador de placas de titanio, necesario para mantener la temperatura de 17,5 a 18,5 °C del agua constante en los acuarios, dejó de funcionar antes de la medición T4 y quedó inutilizado para el resto del estudio, por lo que la temperatura del agua no pudo mantenerse constante y paso a variar estacionalmente. Por otro lado, en las instalaciones de Kardala, donde se llevaron a cabo los cultivos RAS, se realizó un desdoble de los muebles de ambos grupos experimentales tras la medición T5, con la intención de prevenir la mortalidad de los juveniles, ya en estadios de desarrollo avanzado, debido a la alta carga de ejemplares en los acuarios y a la baja concentración de oxígeno postprandial en el medio.

El grupo experimental que mostró un mayor crecimiento tanto en peso como en longitud al finalizar el estudio fue el alimentado con pienso de trucha y cultivado en RAS (124,22 g; 20,03 cm), seguido de cerca por el grupo alimentado con pienso de trucha y cultivado en OFS (111,03 g; 19,11 cm), y en menor medida el grupo alimentado con tilapia y cultivado en OFS (105,74 g; 18,75 cm), y el grupo alimentado con tilapia y cultivado en RAS (103,86 g; 18,70 cm); estos dos últimos con apenas diferencias entre sí. A primera vista, los grupos alimentados con pienso de trucha presentan un mayor crecimiento final en términos de peso y longitud, mostrando mayor peso los cultivados en RAS, posiblemente debido a que los acuarios con este sistema presentaban mayor temperatura, como ya se ha mencionado en los factores de confusión; mejorando el aprovechamiento del alimento (Durand y Whitfield, 2015) y la tasa de crecimiento de los muebles (Handeland *et al.*, 2008). Sin embargo, estos muebles presentan mayor heterogeneidad en su peso en comparación con los grupos alimentados con pienso de tilapia, que presentan pesos más parecidos entre los individuos de un mismo cultivo, siendo un factor de interés teniendo en cuenta que en una producción acuícola ideal se debe conseguir que todos los peces aprovechen por igual el alimento. Además, cabe destacar que en los cultivos OFS, el incremento de biomasa fue mayor durante los periodos T2 – T4 y T4 – T5 para los muebles alimentados con pienso de tilapia, lo que indica un mejor rendimiento de este pienso a lo largo del año; hecho que cabía esperar al tratarse de un pienso con mayor composición en materia vegetal, teniendo en cuenta la naturaleza omnívora de *C. labrosus*.



La ratio de conversión del alimento (FCR) presentó valores más altos para los individuos alimentados con tilapia, es decir, que estos peces requirieron una mayor cantidad de alimento para poder incrementar su biomasa en comparación con los alimentados con pienso de trucha. Este dato coincide con el estudio de Zhou *et al.* realizado en 2013, en el que se observó que una alta ingesta de carbohidratos en la dieta disminuyó la tasa de crecimiento y aumentó el FCR de la dorada de Wuchang; aunque sin afectar demasiado a la tasa de crecimiento, dado que el pienso de tilapia también dispone de una buena composición de proteínas (35 %), necesarias para el incremento de la longitud y el desarrollo del músculo, poniendo de manifiesto la importancia de una dieta con un buen equilibrio entre proteínas y energía no proteica (Altunok y Özden, 2017). Cabe destacar que los valores medios de FCR observados en los cultivos RAS son considerablemente mayores en comparación con los cultivos OFS. Esto se debe a que en el periodo T5 – T6, los valores de FCR ascienden en gran medida para ambos grupos experimentales (trucha:7,96 y tilapia:15,41), posiblemente debido a que tras la medida T5 se realizaron desdobles de individuos para ambos grupos, lo que implica que, con un estadio juvenil avanzado y un peso y tamaño considerables, teniendo en cuenta el estrés generado en el proceso de desdoble; los mubles requerirían una mayor cantidad de alimento, al menos en un inicio, para incrementar su biomasa por un descenso en el aprovechamiento de los nutrientes, especialmente en el pienso de tilapia por presentar alta composición en carbohidratos (Zhou *et al.*, 2013). Este descenso en el aprovechamiento de los nutrientes de los mubles cultivados en RAS en el periodo T5 – T6 se confirmaría al observarse a su vez descensos considerables en los valores respectivos de tasa de crecimiento específico (SGR) y ratio de eficiencia proteica (PER).

Teniendo este factor de confusión en cuenta, se observaron valores más altos de ratio de efectividad proteica (PER) en los grupos experimentales alimentados con pienso de tilapia, observándose el mejor valor en los individuos cultivados en OFS. Ha de tenerse en cuenta en este parámetro que en el periodo T2 – T4, el intercambiador de la bomba de agua de los cultivos OFS quedó inutilizado provocando un gran descenso de la temperatura, dando lugar a un descenso de la SGR y un aumento considerable de FCR, que fueron recuperando sus valores óptimos en el periodo T4 – T5, con el aumento de la temperatura estacional del agua; aunque en el periodo T5 – T6 las temperaturas volvieron a descender, provocando el efecto adverso inicial. Este descenso de temperatura afectó en mayor medida al valor de PER en el grupo experimental alimentado con pienso de trucha, descendiendo de 0,77 a 0,35; mientras que en el grupo alimentado con tilapia el descenso fue de 0,70 a 0,52. Según varios estudios llevados a

cabo con distintas especies de peces (Sweilum, 2005; Siddiqui y Khan, 2009; Amoah, 2012; Altunok y Özden, 2017), se describe que dietas con altos niveles proteicos, como es el caso del pienso para trucha (44 % de proteína), presentan un descenso del PER. Además, según Carvalho *et al.* (2010), el porcentaje ideal de proteína en una dieta para mubles en estadio juvenil es del 35 %, lo cual coincide con el porcentaje de proteínas del pienso de tilapia (Tabla 1). Esta información se confirma con el valor PER de 0,90 en el periodo T4 – T5 para el grupo alimentado con pienso de tilapia en cultivo OFS, siendo el más alto observado en todo el estudio.

En cuanto a la tasa de crecimiento específica (SGR) observada, teniendo en cuenta los factores de confusión anteriormente mencionados, fue bastante similar entre los grupos experimentales alimentados con pienso de trucha y los alimentados con pienso de tilapia, siendo ligeramente superiores los valores obtenidos para los primeros, lo cual podría ser debido a la composición del pienso comercial de trucha (Tabla 1), que posee un alto componente lipídico (21 %).

El valor medio del índice hepato-somático (HSI) obtenido en este estudio fue mayor en los cultivos de mubles alimentados con pienso de tilapia en ambos tipos de sistemas (OFS y RAS). El pienso de tilapia es muy rico en carbohidratos, siendo el más abundante de sus componentes (45 %). Dado el alto porcentaje en carbohidratos, su exceso en el hígado puede derivar en dos vías: la síntesis de glucógeno o la lipogénesis (Zhou *et al.*, 2013). A partir de las imágenes de tejido hepático, obtenidas de las muestras histológicas de T6 para cada grupo experimental en ambos sistemas de cultivo, y consultando resultados de muestras de hígado teñidas con ORO con presencia de lípidos neutros en los meses iniciales, obtenidas de estudios anteriores (Duncan, 2019); se propuso que el exceso de carbohidratos en el hígado de los individuos alimentados con pienso de tilapia posiblemente era metabolizado a grasa por medio de la lipogénesis, provocando la acumulación de lípidos en el hígado; pudiendo observarse un nivel alto de vacuolización de los hepatocitos en las presentaciones mencionadas, lo que explica un mayor HSI en comparación con el pienso de trucha. Este hecho lo corroboran Kamala y Panserat (2016), quienes afirman que un consumo de carbohidratos en exceso genera un exceso de energía que puede ser almacenada como lípidos en el hígado o como tejido adiposo en otros órganos a través de un proceso denominado lipogénesis *de novo*. Este dato ha de tenerse en consideración, ya que en otros estudios se ha observado que una acumulación excesiva de lípidos en el hígado puede llegar a causar daños hepáticos (Prisingkorn *et al.*, 2017) e incluso esteatosis hepática (Turola *et al.*, 2015). Por otra parte, también se observó acumulación de lípidos en las muestras histológicas de tejido hepático de la disección T6 para el grupo

alimentado con pienso de trucha, que podría deberse al alto porcentaje de grasas que presenta este pienso. Sin embargo, también se observó una acumulación abundante de lípidos neutros en los tejidos de intestino y lamina propia de los peces alimentados con pienso de trucha, que no se observó en los mubles alimentados con pienso de tilapia. La alta acumulación de grasa perivisceral de este grupo experimental también fue observada durante las disecciones realizadas en T6. Según Pujante *et al.*, 2019, en su estudio sobre la “fisiología y bioquímica digestiva de la liseta (*C. labrosus*)”, el perfil enzimático observado en esta especie presenta una baja actividad lipasa y una alta actividad amilasa, que podría apuntar a que en el medio natural el alimento preferente de la especie muestra un bajo contenido en lípidos y posiblemente una mayor relación con un uso significativo o incluso preferente de los carbohidratos como fuente de energía. Siendo así, la baja actividad de la enzima lipasa en el tracto intestinal podría ser la causa de la acumulación de lípidos neutros en las vellosidades de los mubles alimentados con pienso de trucha, debido a la alta composición lipídica (21 %) del pienso. Además, una acumulación excesiva de lípidos neutros en la lámina propia del intestino podría causar a la larga problemas en la absorción y asimilación de nutrientes en estadios juveniles avanzados, pudiendo derivar en un aumento de los valores de FCR y una disminución de la SGR (Duncan, 2019); por lo que es un dato importante a tener en consideración para la formulación de un pienso eficiente que garantice la salud y la productividad de *C. labrosus*. Cabe mencionar que en los cortes histológicos de intestino teñidos con hematoxilina-eosina de los dos grupos experimentales (trucha y tilapia) en ambos cultivos (OFS y RAS), se observaron infiltraciones de células granulares eosinofílicas en la lamina propia, que podrían estar relacionadas con una inflamación del intestino (Baeverfjord y Krogdahl, 1996), posiblemente provocada por la composición de los piensos comerciales, que no se ajusta a los requerimientos nutricionales óptimos para esta especie. El pienso de tilapia se formula para una especie herbívora mientras que el de trucha está diseñado para esta especie carnívora y de alta demanda energética. Una formulación combinada se ajustaría probablemente más a las necesidades de una especie omnívora como la lisa del presente estudio.

## **Conclusiones**

1.- El grupo experimental alimentado con pienso de tilapia presentó mejores características de cara a un aprovechamiento del alimento de forma más eficiente y sostenible, ya que este pienso contiene una mayor composición en carbohidratos y materia vegetal, que concordarían con la naturaleza omnívora de la especie *C. labrosus*, hecho que se demuestra con valores altos de crecimiento específico y ratio de eficiencia proteica. Sin embargo, este grupo podría presentar

indicios de esteatosis hepática debida a la acumulación de lípidos en el hígado a través de la lipogénesis *de novo*, causada probablemente por el alto contenido de carbohidratos en la dieta.

2.- Los grupos experimentales alimentados con pienso de trucha presentaron individuos con tallas mayores, pero con una peor condición de salud, dada la abundante presencia de grasa perivisceral y lípidos neutros en los tejidos intestinales. Los individuos de este grupo presentaron una ratio de conversión del alimento mejor que los alimentados con pienso de tilapia, sin embargo, un menor contenido en grasa en esta dieta para trucha disminuiría la acumulación de grasa intestinal, permitiendo un mejor aprovechamiento de los nutrientes.

3.- Debido a los factores de confusión acontecidos durante la realización de este estudio, no se han podido obtener datos concluyentes para determinar qué sistema de cultivo (OFS o RAS) ofrece más ventajas para la cría y engorde de la especie *C. labrosus*.

### **Consideraciones finales**

En función de los resultados obtenidos en este y otros estudios previos, y de cara a formular una dieta específica para *C. labrosus*, en futuros estudios deberían considerarse los siguientes aspectos: un aporte proteico de alrededor del 35 %, dado el mayor ratio de eficiencia proteica observado; una disminución del porcentaje de carbohidratos respecto al pienso de tilapia, previniendo así la acumulación de lípidos en el hígado; y un bajo aporte de grasa para evitar una deposición excesiva de lípidos en el tracto digestivo en general, y en la lámina propia de los intestinos en particular, incorporando un nivel nutricional adecuado de ácidos grasos del tipo *omega-3*, como EPA (20:5n-3) y DHA (22:6n-3), que favorezcan el buen estado de salud de los ejemplares y, al mismo tiempo, otorguen a los peces una mayor calidad nutricional como producto final.

### **Bibliografía**

Amoah, Y.T. 2012. Effect of dietary protein levels on growth and protein utilization in juvenile arctic char (*Salvinus alpinus*). The United Nations University Fisheries Training Programme, Hólar, Iceland.

Altunok, M., Özden O. 2017. Effect of dietary protein on the growth of mullet, *Chelon labrosus*, reared in sea cages. Archives of Polish Fisheries, 25 (3), 157-164. doi: 10.1515/aopf-2017-0015

Baeverfjord, G., Krogdahl, A. 1996. Development and regression of soyabean meal induced enteritis in Atlantic Salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Diseases*, 19, 375–387.

Khemis, I.B., Zouiten, D., Besbes, R., Kamoun, F. 2006. Larval rearing and weaning of thick lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) in mesocosm with semiextensive technology. *Aquaculture* 259, 190–201.

- Khemis, I.B., Gisbert, E., Alcaraz, C., Zouiten, D., Besbes, R., Zouiten, A., Masmoudi, A.S. and Cahu, C. 2013. Allometric growth patterns and development in larvae and juveniles of thick-lipped grey mullet *Chelon labrosus* reared in mesocosm conditions. *Aquac Res*, 44: 1872-1888. doi:[10.1111/j.1365-2109.2012.03192.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03192.x)
- Boglione, C., Bertolini, B., Russiello, M., and Cataudella, S. 1992. Embryonic and larval development of the thick-lipped mullet (*Chelon labrosus*) under controlled reproduction conditions. *Aquaculture* 101, 349–359.
- Boglione, C.C., Giganti, M., Cecchetti, M., Di Dato, P., Scardi, M., Cataudella, S. 2006. Biological monitoring of wild thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*), golden grey mullet (*Liza aurata*), thinlip mullet (*Liza ramada*) and flathead mullet (*Mugil cephalus*) (Pisces: Mugilidae) from different Adriatic sites: meristic counts and skeletal anomalies. *Ecological Indicators*, 6, 712–732.
- Carlander, K.D. 1969. Handbook of freshwater fishery biology. University Press, The Iowa State, EEUU. Vol.I 752 pp.
- Carvalho, C.V.A., Bianchini, A., Tesser, M. B., Sampaio, L. 2010. The effect of protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil platanus* (Gunther). *Aquaculture Research*, 41, 511–518. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02340.x>
- Cifuentes, R., González, J., Montoya, G., Jara, A., Ortíz, N., Piedra, P., Habit, E. 2012. Relación longitud-peso y factor de condición de los peces nativos del río San Pedro (cuenca del río Valdivia, Chile). *Gayana (Concepción)*, 76 (Supl. 1), 86-100.
- Comisión Europea. 2009. *Communication from the Commission to the European Parliament and Council. Building a sustainable future for aquaculture. A new impetus for the Strategy for the Sustainable Development of European Aquaculture* (No. COM (2009) 162 final; pp. 1–13). Brussels.
- Crosetti, D., Cataudella, S. 1995. Production of Aquatic Animals, -Fish-. In *The mullets* (pp. 253–268). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands: In: C.E. Nash and A.J. Novotny (eds.).
- Crosetti, D. 2015. Current state of mullet fisheries and culture. In *Biology, ecology and culture of grey mullets (mugilidae)* (pp. 398–450). Roma, Italia: Taylor & Francis Group, LLC.
- Culling, C.F.A. 1974. *Handbook of histopathological and histochemical techniques* (third). Butterworths, Guildford.
- Datta, S.N., Kaur, V.I., Dhawan, A., Jassal, G. 2013. Estimation of length-weight relationship and condition factor of spotted snakehead *Channa punctata* (Bloch) under different feeding regimes. *Springer Plus*, 2(436), 1–5.
- De las Heras, V., Martos-Sitcha, J.A., Yúfera, M., Martínez-Rodríguez, G. 2012. *Chelon labrosus*, posible alternativa a la acuicultura actual en Europa [*Chelon labrosus as a possible alternative for aquaculture in Europe*]. Ciencias Marinas y Costeras al Servicio de la Sociedad (MarCuba2012). Noviembre 2012. La Habana, Cuba.
- Drake, P., Arias, A., Gallego, L. 1984. Biología de los Mugílidos (*Osteichthyes, Mugilidae*) en los esteros de las salinas de San Fernando (Cádiz). III. Hábitos alimentarios y su relación con la morfometría del aparato digestivo. *Inv. Pesq.* 48(2): 337-367.

- Duncan, D. 2019. Differential growth and aspects of the health of *Chelon labrosus* (Risso, 1827) fed on commercial trout and tilapia feeds in Open Flow and a Recirculatory Aquaculture System (Master's thesis, Ghent University, Ghent, Belgium).
- FAO. 2018. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. Roma. <http://www.fao.org/3/I9540ES/i9540es.pdf>
- FAO. 2020. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción*. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>
- FEAP. 2016. <http://feap.info/index.php/data/>
- FishBase. 2020. <https://www.fishbase.se/summary/Chelon-labrosus.html>
- Freyhof, J., Kottelat, M. 2008. *Chelon labrosus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2008* (2015 International Union for Conservation of Nature and Natural Resources No. e. T135689A4182365; pp. 1–8).
- Froese, R. 2006. Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology* 22:241-253.
- Hett, A.K., Nirchio, M., Oliveira, C., Siccha, Z.R., Rossi, A.R., Sola, L. 2011. Karyotype characterization of *Mugil incilis* Hancock, 1830 (Mugiliformes: Mugilidae), including a description of an unusual co-localization of major and minor ribosomal genes in the family. *Neotropical Ichthyology*, 9 (1), 107-112. doi: 10.1590/S1679-62252011005000005
- Kamalan, B.S., y Panserat, S. 2016. Carbohydrates in Fish Nutrition: An overview of what could decide, limit and improve the use of nutritive carbohydrates in fish. *International Aquafeed*, 20–23.
- Kottelat, M., Freyhof, J. 2007. *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin. 646 pp.
- Liao, C. 1981. Cultivation methods. In Oren, O.H. (Ed.), *Aquaculture of Grey Mullet* (pp. 361-390). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Nash, C.E., Shehadeh Z. 1980. *Review of Breeding and Propagation Techniques for Grey Mullet, Mugil cephalus L.* ICLARM, Penang, Malaysia (1980). 87 pp.
- Prisingkorn, W., Prathomya, P., Jakovlic, I., Liu, H., Zhao, Y.H., Wang, W.M. 2017. Transcriptomics, metabolomics and histology indicate that high-carbohydrate diet negatively affects the liver health of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *BMC Genomics*, 18(856), 1–15. <https://doi.org/DOI.10.1186/s12864-017-4246-9>
- Pujante, I.M., Diaz-Lopez, M., Mancera, J.M., & Moyano, F. J. 2017. Characterization of digestive enzymes protease and alpha-amylase activities in the thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*, Risso 1827). *Aquaculture Research*, 48, 367–376. <https://doi.org/doi:10.1111/are.13038>

- Robles, R., Mylonas, C. C. 2017. *Exploring the biological and socio-economic potential of new/emerging candidate fish species for the expansion of the European aquaculture industry*. Impact, Volume 2017, Number 1, January 2017, pp. 14-16(3). Science Impact Ltd. DOI: <https://doi.org/10.21820/23987073.2017.1.14>
- Sarasquete, C., Ortiz-Delgado, J. B., Martos-Sitcha, J. A., de Las Heras, V., Yúfera, M., Martínez, G. 2014. Ontogeny and functional histochemistry of the digestive and visual systems and other organs during the larval development of the thick-lipped grey mullet, *Chelon labrosus*. *Scientia Marina*, 74(4), 1–28.
- Siddiqui, T.Q., Khan, M.A. 2009. Effects of dietary protein levels on growth, feed utilization, protein retention efficiency and body composition of young *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35 (3): 479–488. doi: 10.1007/s10695-008-9273-7
- SOFIA. 2018. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018*. <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture/2018/es/>
- Sogbesan, O.A., Ahmed, Y.M., Ajijola, K.O. 2017. Growth performance, nutrient utilization, somatic indices and cost benefit analyses of African basil leaf additive diets on *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings. *Journal of Animal Research and Nutrition*, 2 (1), 10. doi: 10.21767/2572-5459.100030
- STECF. 2014. *The Economic Performance of the EU Aquaculture Sector (STECF 14-18)* (pp. 1–457) [JCR *Scientific & Policy Reports*]. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Sweilum, M.A. 2005. Growth performance, feed efficiency and digestibility of *Sarotherodon galilaeus* fed on artificial diets varied in protein and energy rates. *The Egyptian Journal of Experimental Biology*, 1, 41-46.
- Turan, C. 2015. Biogeography and Distribution of Mugilidae in the Mediterranean and the Black Sea, and North-East Atlantic. In Crosetti, D. & Blabe, S. (Eds.), *Biology, ecology and culture of grey mullets (Mugilidae)* (pp. 116-127). Rome, Italy: CRC Press.
- Turola, E., Petta, S., Vanni, E., Milosa, F., Valenti, L., Critelli, R., Miele, L., Maccio, L., Calvaruso, V., Fracanzani, A.L., Bianchini, M., Raos, N., Bugianesi, E., Mercorella, S., Di Giovanni, M., Craxì, A., Fargion, S., Grieco, A., Cammà, C., Cotelli, F., Villa, E. 2015. Ovarian senescence increases liver fibrosis in humans and zebrafish with steatosis. *Disease models & mechanisms*. *Disease Models & Mechanisms*, 8: 1037-1046. doi: 10.1242/dmm.019950
- Yan, J., Liao, K., Wang, T., Mai, K., Xu, W., Qinghui A. 2015. Dietary Lipid Levels Influence Lipid Deposition in the Liver of Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*) by Regulating Lipoprotein Receptors, Fatty Acid Uptake and Triacylglycerol Synthesis and Catabolism at the Transcriptional Level. *PLOS ONE* 10(6): e0129937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129937>
- Yúfera, M., Arias, A.M. 2010. *Traditional polyculture in “esteros” in the Bay of Cádiz (Spain). Hopes and expectancies for the prevalence of a unique activity in Europe*. *Aquac. Eur.* 35(3): 22-25.
- Zhou, C.P., Ge, X.P., Liu, B., Xie, J., Miao, L.H. 2013. Effect of high dietary carbohydrate on the growth performance and physiological responses of juvenile Wuchang bream, *Megalobrama amblycephala*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26 (11), 1598-1608. doi: 10.5713/ajas.2012.12659

## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer la ayuda en la realización de este estudio al Dr. Xabier Lekube Iturrioz y al Dr. Urtzi Izagirre Aramaiona por su apoyo y asesoramiento durante mi estancia en el PiE, que me permitieron ganar experiencia y conocimientos sobre el cuidado y mantenimiento de las especies experimentales y su medio; así como por la aportación de los datos y los consejos dados durante la redacción del presente documento, que me permitieron discutir con más rigor los resultados obtenidos. También quisiera agradecer a Manu Soto López, director adjunto del PiE, su acogida en el centro, su disponibilidad a la hora de comentarle dudas y su carácter atento que hicieron que mi estancia en Plentzia fuera más fructífera.

A su vez, quisiera manifestar mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Covadonga Rodríguez González por su eterna paciencia y disposición a la hora de resolver todas mis dudas, así como por su buen asesoramiento.