

Potencial del anfípodo *Elasmopus rapax* como agente de control biológico del parásito monogeneo *Neobenedenia melleni* y como presa viva alternativa en sistemas acuícolas.
Resultados preliminares.

Potential of the amphipod *Elasmopus rapax* as a biological control agent for the monogenean parasite *Neobenedenia melleni* and as an alternative live prey in aquaculture systems.
Preliminary results.

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
Máster en Biología Marina: Biodiversidad y Conservación

Aina Pomerol Olaya

Julio, 2024

La **Dra. Covadonga Rodríguez González**, Catedrática de la Universidad de La Laguna y el **Dr. Manuel A. Marrero Arteaga**, investigador Postdoctoral Contratado de la Universidad de La Laguna, como Tutores Académicos,

DECLARAN:

Que la memoria presentada por **Aina Pomerol Olaya** titulada “**Potencial del anfípodo *Elasmopus rapax* como agente de control biológico del parásito monogeneo *Neobenedenia melleni* y como presa viva alternativa en sistemas acuícolas. Resultados preliminares**” 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 académico 2023-2024.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente informe favorable en San Cristóbal de La Laguna a **6 de julio** de 2024.

Fdo. **Dra. Covadonga Rodríguez González**

Fdo. **Manuel A. Marrero Arteaga**

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1 Primer experimento	16
3.1.1 Preparación de placas.....	16
3.1.2 Mantenimiento de las placas.....	16
3.1.3 Recuento de huevos	16
3.1.4 Manejo de anfípodos muertos.....	17
3.2 Segundo experimento	17
3.2.1 Preparación de placas.....	17
3.2.2 Recuento de huevos	18
3.3 Tercer experimento	18
3.3.1 Preparación de placas.....	18
3.3.2 Mantenimiento	18
3.4 Análisis lipídico	19
3.4.1 Extracción lipídica	19
3.4.2 Determinación del perfil de ácidos grasos	21
3.4 Análisis de datos	23
4. RESULTADOS	24
4.1 Primer experimento	25
4.2 Segundo experimento	26
4.3 Tercer experimento	27
4.4 Contenido lipídico y perfil de ácidos grasos	28
5. DISCUSIÓN	30
6. CONCLUSIONES	37
7. AGRADECIMIENTOS	38
8. BIBLIOGRAFÍA	39
8.1 WEBGRAFÍA	42

RESUMEN

La acuicultura se presenta como una solución clave para satisfacer la demanda de productos marinos saludables y seguros en una población global en crecimiento. Sin embargo, para lograr un desarrollo sostenible de la acuicultura, es fundamental abordar y minimizar los impactos ambientales asociados a esta actividad. En este estudio se investiga un método de control biológico para reducir el impacto del parásito monogéneo *Neobenedenia melleni* en el cultivo de *Seriola dumerili*, como especie de alto valor comercial severamente afectada por estos ectoparásitos, mediante el uso de un anfípodo presente en las instalaciones de cultivo y que podría constituir una presa alternativa de interés en el cultivo larvario de especies marinas. Se realizaron tres experimentos utilizando el anfípodo *Elasmopus rapax* para evaluar su potencial como agente de control biológico del parásito, obteniéndose evidencias del consumo de huevos del parásito, especialmente durante los primeros días tras colocar los anfípodos junto con los huevos. Así mismo, se analizó el valor nutricional de *E. rapax*, encontrándose una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie omega-3 (omega-3 LC-PUFA; EPA y DHA) esenciales para el desarrollo larvario. Los resultados sugieren que, por su tamaño y composición, estos organismos podrían ser considerados como presas vivas para la alimentación de larvas de especies de interés acuícola.

Palabras clave: Acuicultura, control biológico, *Elasmopus rapax*, *Neobenedenia melleni*, omega-3 LC-PUFA, *Seriola dumerili*

ABSTRACT

Aquaculture is presented as a key solution to meet the demand for healthy and safe seafood products in a growing global population. However, to achieve sustainable aquaculture development, it is essential to address and minimize the environmental impacts associated with aquaculture. This study investigates a biological control method to reduce the impact of the monogenean parasite *Neobenedenia melleni* on the culture of *Seriola dumerili*, a species of high commercial value severely affected by these ectoparasites, using an amphipod present in the culture facilities and which could constitute an alternative prey of interest in the larval culture of marine species. Three experiments were carried out using the amphipod *Elasmopus rapax* to evaluate its potential as a biological control agent of the parasite, obtaining evidence of parasite egg consumption, especially during the first days after placing the amphipods together with the eggs. The nutritional value of *E. rapax* was also analyzed, finding a high proportion of long-chain polyunsaturated fatty acids of the omega-3 series (omega-3 LC-PUFA; EPA and DHA) essential for larval development. The results suggest that, due to their size and composition, these organisms could be considered as live prey for feeding larvae of species of aquaculture interest.

Keywords: Aquaculture, biological control, *Elasmopus rapax*, *Neobenedenia melleni*, omega-3 LC-PUFA, *Seriola dumerili*

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la población mundial ha disminuido en los últimos años en comparación con las últimas cuatro décadas. No obstante, las proyecciones indican que para el año 2030 alcanzaremos los 8.500 millones de personas (FAO, 2024) y para el año 2050 se estima una población de 10.000 millones de personas (FAO, 2022). Este aumento poblacional implicará una mayor demanda de alimentos, requiriendo un incremento del 22% en la producción de alimentos acuáticos de origen animal para satisfacer las necesidades de la población mundial en el año 2050 (FAO, 2024).

La pesca extractiva y la acuicultura pueden proporcionar una fuente de proteína animal saludable y de alta calidad, con una huella ecológica menor que la de la agricultura de animales terrestres. A medida que la demanda mundial de productos del mar siga aumentando, la acuicultura se convertirá en una fuente clave de suministro. Los alimentos provenientes del mar aportan proteínas, ácidos grasos Omega-3 LC-PUFA esenciales para el desarrollo cerebral y la reducción del riesgo de enfermedades (cardiovasculares, neurodegenerativas, de carácter inflamatorio, etc.), iodo (fundamental para el buen funcionamiento de la tiroides y el neurodesarrollo), Vitamina D (importante para la regulación del sistema inmune, el desarrollo mental y la salud ósea), hierro (esencial durante el embarazo), calcio, zinc y otros minerales cruciales para el desarrollo (Reef Resilience Network, 2024). Por estas razones, se consideran alimentos que contribuyen a garantizar la seguridad alimentaria mundial, y su producción desempeña un papel importante en la transformación de los sistemas alimentarios y la lucha contra el hambre y la malnutrición.

La acuicultura se define como la cría o cultivo en condiciones controladas de especies que se desarrollan en el medio acuático, como peces, moluscos, crustáceos y algas, en cualquiera de sus fases, utilizando técnicas para hacer más eficiente su producción. Es una actividad que está ligada a la intervención humana para aumentar la producción mediante la concentración de poblaciones, su alimentación y la protección frente a depredadores (FAO, 2024). Las finalidades de la acuicultura son diversas, incluyendo el consumo directo, la repoblación, la acuariología y la obtención de subproductos de aplicación biotecnológica. Es el sector alimentario de crecimiento más acelerado a nivel mundial, con un gran potencial de expansión. En el año 2022, la producción

mundial en acuicultura de animales acuáticos alcanzó los 94 millones de toneladas, superando los 91 millones de toneladas obtenidas en pesca. El consumo de productos acuáticos continúa en aumento, con un crecimiento global en el consumo per cápita del 1,4% anual entre 1961 y 2021 (FAO, 2022). Este incremento es posible gracias a los avances tecnológicos de preservación y distribución del producto, los cambios en las preferencias de los consumidores y el aumento de los ingresos. Ahora bien, aunque la acuicultura puede ser menos agresiva ambientalmente que la cría de animales terrestres sigue siendo una actividad con un gran impacto a nivel mundial. Por ello, es vital desarrollar una acuicultura sostenible que respete el medio ambiente y contribuya al mantenimiento e incremento de la biodiversidad. Además, debe fomentar el desarrollo socioeconómico de las comunidades donde se realiza, integrándose con las otras actividades marinas mediante una gestión integrada del territorio, generando empleo y garantizando su viabilidad y perdurabilidad en el tiempo.

La Unión Europea, en 2021 creó el Fondo Europeo Marítimo, de Pesca y de Acuicultura para el período 2021-2027, en sustitución del anterior Fondo Europeo de Pesca (FEMP). Este fondo pretende contribuir a la aplicación de la política pesquera común, con las principales prioridades de fomentar la pesca sostenible, la recuperación y conservación de los recursos acuáticos, promover actividades sostenibles en acuicultura, permitir una economía azul sostenible y apoyar el desarrollo de las comunidades pesqueras y acuícolas, así como reforzar la gobernanza internacional de los océanos y mares. Los principales impactos generados por esta actividad representan desafíos que deben ser abordados para desarrollar una acuicultura más sostenible. En la siguiente tabla (Tabla 1), se recogen estos aspectos en términos generales.

Principales impactos	Retos
Acumulación de residuos y creación de una zona muerta	Refuerzo de la implementación de Planes de Minimización de Residuos. Mejora de la tecnología alimentaria.
Escapes de especies nativas y modificaciones genéticas	Mejora del conocimiento acerca del comportamiento de ejemplares escapados y de su interacción con las poblaciones silvestres. Mejora de guías y protocolos de

	prevención de escapes y de respuesta rápida para la recaptura.
Incubación de enfermedades y transmisión de parásitos	Desarrollo de nuevas vacunas, probióticos y estrategias de control biológico.
Interacción con depredadores	Analizar las interacciones con el entorno para establecer criterios de gestión de los depredadores.
Introducción de especies no nativas	Aplicación efectiva de la normativa en materia de especies exóticas y refuerzo de la coordinación entre agentes.
Alimentación con pescado y harinas y aceites procedentes del pescado (Índice FIFO; “fish in fish out”)	Reducir la dependencia de la harina y los aceites de pescado, mejorar el proceso de alimentación para un mayor aprovechamiento del pienso y mejora de los índices de conversión. Búsqueda de presas alternativas e ingredientes dietarios ricos en omega-3 LC-PUFA.
Uso de antibióticos, hormonas, parasiticidas, etc.	Buscar estrategias sostenibles como probióticos y control biológico para disminuir el uso de químicos.

Tabla 1. Principales impactos que genera la acuicultura y consecuentes retos que se plantean para mejorar su sostenibilidad.

En el año 2022, tanto la producción mundial de animales acuáticos y algas como la producción acuícola en concreto alcanzaron sus cifras máximas. Además, por primera vez la producción de especies animales procedentes de la acuicultura superó la de la pesca de captura (FAO, 2024).

A nivel mundial, el mayor productor de animales acuáticos es China, siendo los países asiáticos los que aportaron el 70% de la producción mundial, seguidos por Europa, América Latina y el Caribe (FAO, 2024). En Europa, el 67% de la actividad se concentra en España, Francia, Grecia e Italia, donde más de la mitad del volumen de producción corresponde a mariscos, el 21% a peces marinos y el 28% a peces de agua dulce. Las especies más cultivadas en Europa son el mejillón, la trucha, la ostra, la dorada, la lubina, la carpa y el atún (European Commission, 2021). En España, el principal productor de la UE, la especie más cultivada es el mejillón, seguido por la lubina, la trucha arco iris y el atún rojo (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2022).

Según datos del Gobierno de Canarias y de la Asociación de Productores Marinos (APROMAR), el archipiélago es el segundo productor nacional de dorada y lubina de acuicultura, aportando más de 7.000 toneladas de pescado al año, suponiendo un impacto significativo en la alimentación, la sociedad y la economía local. Actualmente en Tenerife se cultivan dorada (*Sparus aurata*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*) en 23 explotaciones acuícolas, con un máximo autorizado de producción de 4.800 toneladas anuales (Cabildo de Tenerife, 2024; APROMAR, 2023). Sin embargo, la consolidación de la producción de medregal (*Seriola dumerili*) en acuicultura permitiría aumentar la capacidad de producción acuícola en los espacios definidos por el Plan de Ordenación de la Acuicultura (PROAC), diversificando la acuicultura local e incrementando el número de empresas del sector (Europa Azul, 2022).

La seriola (*Seriola dumerili*), también conocida como medregal o pez limón (Figura 1) es una especie de la familia Carangidae con una amplia distribución mundial en mares y océanos de temperaturas cálidas y templadas (Fishbase, 2024). Se trata de una especie nectónica que habita en la plataforma entre los 50 y los 150 metros de profundidad. Puede llegar a tener una longitud de 2 metros y un peso de entre 25 y 40 kg (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2024).



Figura 1. *Seriola dumerili*. Fuente: Turnbull, J. (Flickr)

Es un pez de elevado valor comercial debido a la buena calidad de su carne, que posee grandes propiedades nutricionales como proteínas, hidratos de carbono, Omega-3 LC-PUFA,

minerales y vitaminas. El cultivo del género *Seriola* ha estado mayoritariamente localizado en Japón, China, Australia, Nueva Zelanda, Hawái y México. En 2002, un equipo del Instituto Español de Oceanografía (IEO) de Tenerife (Islas Canarias, España), dirigido por el Dr. Salvador Jerez Herrera, logró la primera puesta espontánea en cautividad de esta especie (Jerez *et al.* 2006), realizando un importante avance para el sector de la acuicultura europea siendo Canarias y la isla japonesa de Chichi-jima las únicas en conseguir estas puestas espontáneas (ULPGC, 2023). El interés de esta especie para la diversificación acuícola en Canarias ha motivado el desarrollo posterior de numerosos proyectos financiados por parte de los centros de investigación acuícola de las islas (IEO-CSIC, ULL, ULPGC), dando lugar a varias tesis doctorales y publicaciones destinadas a mejorar su desarrollo y reproducción en cautividad (Monge-Ortiz *et al.*, 2018; Rodríguez-Barreto, 2014; Rodríguez Barreto *et al.* 2017; Sarih *et al.*, 2020; Zupa *et al.*, 2016; Pousis *et al.*, 2019). En definitiva, su distribución natural en las islas, su elevada tasa de crecimiento y el gran tamaño corporal, la capacidad para aceptar alimentos inertes y la buena adaptación al cautiverio han sido motivos de peso para considerar esta especie como una de las principales candidatas para diversificar la acuicultura europea.

El año 2022, España generó 146,84 toneladas de seriola, producidas en la Comunidad Valenciana y en Murcia (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2022). Ese mismo año se inició el proyecto PLANASER 2.0 dentro del marco del “Plan Nacional de Consolidación del Cultivo de *Seriola (Seriola dumerili)*”, con el objetivo de posicionar España como referente internacional en el cultivo de esta especie. La obtención sostenible de puestas fuera del período de reproducción natural, la mejora nutritiva, la estandarización de las dietas comerciales y el bienestar y la salud de los reproductores fueron los principales propósitos planteados en este proyecto. También se planteó abordar la problemática causada por la presencia de ectoparásitos monogéneos como *Neobedenia sp.* o *Zeuxapta sp.*, definiendo un protocolo de tratamiento antiparasitario oral optimizado que sea autorizado para su uso en el engorde comercial del medregal (Europa Azul, 2022). Todos estos aspectos, venían siendo abordados desde el año 2013, durante la ejecución del proyecto europeo DIVERSIFY (DIVERSIFY, 2023), con la participación, entre sus 38 socios, del IEO-CSIC de Tenerife, y la ULL.

Los parásitos de la clase Monogenea, pertenecientes al filo de los Platelminetos, son muy frecuentes sobre todo en branquias y superficies externas de los peces, tanto marinos como de agua dulce. Son aplanados dorsoventralmente y presentan un órgano de adhesión posterior llamado opistohaptor, provisto de ganchos y ventosas, y un órgano de fijación llamado prohaptor, mediante el cual se fijan al hospedador. Este último carácter es el que permite diferenciar la clase Monogenea de las clases Digenea y Cestoda. Son organismos hermafroditas con un ciclo biológico directo, es decir, con un solo hospedador. Los adultos depositan los huevos directamente en el agua o en el cuerpo del hospedador, y estos se fijan en un sustrato mediante un largo filamento o zarcillo. Cuando el huevo eclosiona, sale el oncomiracidio, una larva ciliada capaz de desplazarse y fijarse a la piel y las branquias del hospedador. Estos organismos, en condiciones naturales, no son especialmente perjudiciales para los peces. Sin embargo, cuando se concentran en las instalaciones de acuicultura, pueden llegar a producir grandes infestaciones llegando a generar mortalidades masivas (Villena et al., 2019).

El adulto de *Neobenedenia melleni* (Figura 2.C) se caracteriza morfológicamente por tener un cuerpo ovalado, aplanado dorsoventralmente, con una longitud de 1 a 2 mm y una anchura de 2,20 a 4,20 mm. Posee una cabeza triangular con dos ventosas y dos ojos simples. Su coloración es blanca translúcida y su superficie está cubierta por espinas dorsales y ventrales. Los órganos internos son visibles a través de la cutícula transparente. Presentan glándulas cefálicas en la ventosa anterior de la cabeza, mediante las cuales secretan una sustancia adhesiva que les permite unirse al huésped. Son organismos ovíparos y los huevos son liberados por los adultos una vez realizada la fecundación. Los huevos, de unos 80 μm , se encuentran encapsulados por una estructura proteica que confiere protección al embrión en desarrollo y lo resguarda de la digestión, la mayoría de los químicos y las bacterias (Hoai y Hutson, 2014). Tienen una coloración marrón, son operculados y tetraédricos (Figura 2.A). La eclosión se produce aproximadamente entre 5 y 8 días después de la liberación, aunque este tiempo puede variar según la temperatura (Deveney et al., 2001).

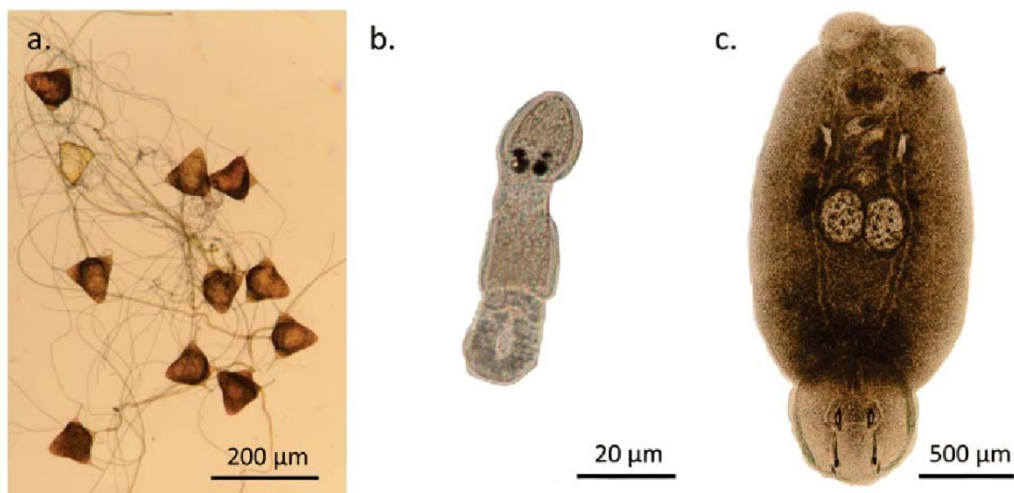


Figura 2. Fases vitales de *Neobenedenia* sp. A) Huevos, B) Oncomiracidio (<de 3 horas), C) Adulto (10 días). Fuente: Trujillo González, 2015

Una vez eclosiona el huevo, por uno de los extremos puntiagudos del tetraedro sale el oncomiracidio (Figura 1.B), que se desplaza hasta su huésped mediante la detección de sustancias químicas presentes en el epitelio de los peces. Cuando localiza al huésped, principalmente se adhiere a su piel y a sus ojos. Su presencia provoca inflamación dérmica, pérdida epidérmica, despigmentación de la piel, reducción de células mucosas y, consecuentemente, una disminución de la producción mucosa y una reducción de las barreras inmunológicas (Hoai y Hutson, 2014). Estas afectaciones físicas también conllevan alteraciones del comportamiento, como el roce contra las rocas y el sustrato, que puede causar lesiones e infecciones secundarias. Los peces parasitados normalmente muestran lesiones córneas y de la piel, ceguera, debilidad, anorexia, hemorragias, hipersecreción de mucus y pueden llegar a morir si estas infecciones secundarias no se tratan (Kerber *et al.*, 2011). Este parásito muestra poca especificidad y, al estar presente tanto en seriola como en dorada (*Sparus aurata*), se ha relacionado con mortalidades directas e indirectas de diferentes especies de aguas cálidas y templadas, si bien, el grado de afección en la seriola es muy superior. Además, el uso de jaulas de cultivo para producir ambas especies en instalaciones próximas podría favorecer la dispersión de dichos parásitos, amenazando la producción de ambas especies (Jerez Herrera *et al.*, 2022).

Los investigadores del IEO-CSIC de Tenerife, diseñaron un sencillo sistema de seguimiento del número de parásitos en cada tanque, mediante la estimación del número de huevos de estos ectoparásitos presentes en el cultivo (Cejas *et al.*, 2014). Dicho sistema consiste en una

red de nylon en forma de disco que tiene 1,5 mm de luz de malla, en la que quedan atrapados los huevos de los parásitos monogéneos, tanto de *Zeuxapta seriolae* como de *Neobenedenia melleni*. Cuando se detecta un grado de infección elevado en los tanques, es cuando se procede a aplicar métodos de control de la infección.

Para combatir las infecciones por parte de los ectoparásitos se han estudiado diversos tratamientos. Entre ellos se encuentran los baños de agua dulce o de baja salinidad, relativamente efectivos tanto para oncomiracidios como para adultos; los baños en peróxido de hidrógeno, con concentraciones de 500 ppm; los baños con manosa, que pueden reducir hasta un 62% el número de huevos emitidos diariamente en el tanque después de 5 días de tratamiento (Villena *et al.*, 2019); los baños con formol, aunque al ser tóxicos y cancerígenos, requieren un bajo número de aplicaciones; o los tratamientos con praziquantel (Bader *et al.*, 2019) y metronidazol, que no son muy recomendables debido a su bioacumulación y riesgo para la salud humana, así como las vacunas que están bajo investigación actualmente. También se ha investigado el refuerzo del sistema inmune mediante la modificación de la flora bacteriana intestinal con trasplantes de microbiota fecal (Villena *et al.*, 2019) o con dietas inmunoestimulantes. Estos tratamientos presentan una efectividad variable y requieren tiempo y trabajo, pudiendo causar estrés en los peces, incluso la muerte en casos extremos. Por este motivo, en el ámbito de la acuicultura sostenible y el desarrollo de nuevas estrategias para combatir las infecciones ectoparasitarias, se plantean opciones como la utilización de extractos de origen natural como el jengibre (Trasviña-Moreno, 2018), el manejo de factores ambientales como la luz, la temperatura y la salinidad, o el control biológico.

Esta última estrategia es en la que se centra este trabajo, pues el control biológico tiene un potencial muy elevado como posible mecanismo para desarrollar una acuicultura más sostenible. Este concepto implica el uso de organismos vivos para controlar las poblaciones de otros organismos, en este caso, parásitos. La actividad limpiadora de los peces y crustáceos marinos es bien conocida y se ha observado en la naturaleza como una forma de simbiosis entre dos especies, consistiendo la interacción en que la especie limpiadora elimina los ectoparásitos y los tejidos muertos de la otra, obteniendo ambas un beneficio (Erkinharju *et al.*, 2021).

En 2016, se estimaba que había aproximadamente un total de 208 especies de peces limpiadores de 106 géneros distintos y 51 especies de camarones de 11 géneros distintos. Se observó que estas interacciones son más comunes en aguas tropicales que en aguas templadas y contribuyen a la salud general de los ecosistemas (Vaughan *et al.*, 2017). Ejemplos de peces limpiadores incluyen especies de la familia Labridae, como *Thalassoma hardwicke*, *Thalassoma purpureum*, *Thalassoma bifasciatum*, comunes en arrecifes de coral, y *Thalassoma pavo*, presente en el Atlántico oriental y la zona meridional del Mediterráneo. También destacan numerosas especies de la familia Gobiidae, como *Gobiosoma genie* y *Tigrigobius digueti*, y varias especies del género *Elacatinus*. En cuanto a los camarones, el género *Lysmata* y la familia Hippolytidae son particularmente relevantes en este sentido (Vaughan *et al.*, 2017).

Estos organismos se han captado en la naturaleza limpiando a otros peces como tiburones, meros, pargos, morenas, rayas y mantas, beneficiando así la salud de estos. El científico Geoffrey W. Potts observó comportamientos de limpieza entre peces en un acuario público y, combinando estas observaciones con estudios de laboratorio y de campo, identificó tres nuevas especies limpiadoras, conocidas hoy en día como *Symphodus melops*, *Ctenolabrus rupestris* y *Centrolabrus exoletus* (Potts, 1973). Este estudio inspiró investigaciones posteriores sobre el potencial de los peces limpiadores como método alternativo para el control de ectoparásitos en acuicultura (Vaughan *et al.*, 2017).

Además de los parásitos monogéneos, dos de los parásitos que afectan considerablemente a la industria acuícola a nivel mundial son el piojo del salmón (*Lepeophtheirus salmonis*) y el piojo de mar (*Caligus elongatus*), que representan una amenaza para el cultivo del salmón del Atlántico (*Salmo Salar*). Estos parásitos dañan la piel, las mucosas y la sangre de los peces, causando fallos en la osmorregulación, estrés e inmunosupresión (Overton *et al.*, 2020). Sin embargo, durante las últimas dos décadas se han utilizado peces limpiadores en las jaulas de mar para el cultivo de salmón Atlántico, con aproximadamente 60 millones de peces limpiadores utilizados cada año en Noruega, Escocia, Irlanda y las Islas Feroe (Gentry *et al.*, 2020). Algunas de las especies utilizadas son el centrolabro (*Centrolabrus exoletus*), el tabernero (*Ctenolabrus rupestris*), el tordo (*Symphodus melops*), el bodión (*Labrus mixtus*) y la margota (*Labrus bergylta*) (Vaughan *et al.*, 2017). El uso de peces limpiadores reduce o elimina la necesidad de usar productos químicos a los

que los piojos han desarrollado resistencia (Aaen *et al.*, 2015), lo que mejora la salud de los peces, reduce costes y elimina residuos de fármacos. Sin embargo, es importante considerar la naturaleza de los peces limpiadores para optimizar su eficacia. Por ejemplo, los lábridos se pueden incluir durante primavera y verano, pero su actividad disminuye a temperaturas inferiores a los 6°C. Contrariamente, los lumpos, del género *Cyclopterus*, más estudiados durante los últimos años como potenciales limpiadores en altas latitudes, pueden soportar temperaturas de otoño e invierno (Overton *et al.*, 2020). Ambos grupos se utilizan en la actualidad en Noruega para el cultivo de salmón Atlántico y trucha arcoíris. En 2023, se usaron un total de 29.894 peces limpiadores, de los cuales 18.020 procedieron de cultivo y 11.874 eran salvajes (Directorate of Fisheries, 2024).

Aunque el uso de especies limpiadoras en cultivos de acuicultura ofrece grandes beneficios, también conlleva una serie de inconvenientes que pueden plantear nuevos desafíos para los cultivos y el medio ambiente. Uno de los inconvenientes es el origen de los peces limpiadores, ya que muchos provienen del medio salvaje y su extracción puede suponer desequilibrar las poblaciones naturales y los ecosistemas litorales (Dipper, 2022). Otro desafío es garantizar la eficacia de esta estrategia, es decir, asegurarse de que los peces se alimentan de los parásitos, ya que pueden mostrar un comportamiento alimentario oportunista y consumir no solo el parásito de interés sino también restos orgánicos, biofouling y otros organismos presentes en la jaula, disminuyendo así las tasas de eliminación del parásito, como se ha observado en el lumpo (Imsland *et al.*, 2015).

No solo los peces tienen esta capacidad limpiadora, sino que como se ha comentado anteriormente, también se han observado camarones con este comportamiento. En 2005, se realizó el primer estudio que proporcionó evidencia de la eliminación y consumo de parásitos por parte de camarones limpiadores salvajes, concretamente *Ancylomenes perdersoni* y *Urocaridella sp.* (Becker y Grutter, 2005), ambos de la familia Palaemonidae. Se utilizaron *Palaemon adspersus*, *Palaemon elegans* (Östlund *et al.*, 2005), *Ancylomenes holthuisi* y *Urocaridella sp.* (Becker y Grutter, 2004) en condiciones de laboratorio y se descubrió que los camarones limpiadores también pueden consumir ectoparásitos monogéneos. Aunque su detección en el contenido estomacal es más complicada que en el caso de otros parásitos crustáceos debido a sus cuerpos blandos y su pequeño tamaño, los monogéneos se pueden identificar debido a que poseen ganchos esclerotizados en el haptor y otras estructuras que no son digeridas por las enzimas (Vaughan *et*

al., 2017). Otras evidencias de gran interés para este estudio fueron las pruebas antecedentes de que el camarón limpiador del norte (*Lysmata amboinensis*) es un limpiador muy eficiente a la hora de consumir huevos de monogeneos y oncomiracidios de *Neobenedenia sp.* en cautividad, donde se ha comprobado que es capaz de reducir las tasas de infección (Militz y Hutson, 2015). Utilizar crustáceos limpiadores en vez de peces limpiadores presenta algunas ventajas, ya que mientras que los peces tienen potencial para transmitir enfermedades a sus “clientes”, en el caso de los crustáceos, como la distancia evolutiva entre estos y los peces es mayor, la capacidad de transmisión de enfermedades se ve limitada (Militz y Hutson, 2015).

El orden Amphipoda se caracteriza por su abundancia en biomasa y densidad, así como por su diversidad, omnivoría, oportunismo y adaptabilidad en cuanto a la dieta (Giari *et al.*, 2020). Además, su alta tasa de reproducción, rápido crecimiento y valor nutricional los posicionan como una posible fuente de alimento en acuicultura (Lolas *et al.*, 2018). *Elasmopus rapax* (Costa, 1853) (Figura 3), perteneciente a la familia Maeridae, es una especie que se encuentra distribuida a nivel mundial en un rango de distribución subtropical. Se encuentra presente hasta los 50 metros de profundidad y habita los fondos duros en el noroeste Pacífico, el noreste Atlántico y el Mediterráneo. Los organismos de esta especie son gonocóricos y presentan dimorfismo sexual, siendo los machos más grandes que las hembras. Los machos localizan a las hembras potenciales mediante sus antenas, detectando las feromonas liberadas por las hembras. El macho libera el esperma en la bolsa de la hembra, y unas horas más tarde, la hembra libera allí también sus huevos para la fertilización. Los huevos se desarrollan en la bolsa (Figura 3), donde los juveniles permanecen durante unos días después de eclosionar y antes de ser liberados al exterior (Sea Life Base, 2024).



Figura 3. *Elasmopus rapax*. La flecha indica la posición de la bolsa.
Fuente: Aphotomarine.com (2024).

Investigadores y trabajadores del IEO-CSIC de Santa Cruz de Tenerife observaron recientemente la presencia del anfípodo *E. rapax* en tanques con peces infectados por *N. melleni*. Este centro se abastece directamente con agua de mar en la que llegan asociados algunos organismos como son los anfípodos de esta especie. Su presencia avivó la curiosidad para tratar de descubrir si estos invertebrados podrían estar alimentándose de los parásitos presentes en los tanques, incluyendo el ectoparásito *N. melleni*, actuando así como vector de control biológico. Su potencial adicional como presa viva alternativa para la alimentación larvaria de diversas especies de interés acuícola, justificarían el planteamiento de su cultivo con este doble propósito. Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto y en el marco del proyecto THINKINAZUL, se plantea una colaboración entre la Universidad de La Laguna y el IEO para el desarrollo del presente trabajo de fin de máster.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La utilización de *E. rapax* como estrategia de control biológico en el cultivo de *S. dumerili* se plantea como una estrategia complementaria al uso de vacunas y otros métodos desparasitarios para reducir la incidencia del monogeneo *N. melleni*, causante de infestaciones con graves consecuencias en las instalaciones acuícolas. Por otra parte, para producir de manera intensiva una especie acuícola, es imprescindible asegurar la obtención de larvas en cantidad y de calidad suficiente para sostener la producción. Estas requieren de un gran aporte de lípidos durante sus primeras fases de desarrollo, siendo crucial la ingesta de ácidos grasos esenciales como el ácido eicosapentanoico (EPA), el ácido docosahexanoico (DHA) y el ácido araquidónico (ARA). En especies como el rodaballo, la lubina y la dorada, se han utilizado rotíferos y artemia, que son las presas vivas más populares. Estas requieren de un previo enriquecimiento con omega-3 LC-PUFA y de cultivos auxiliares de fitoplancton que suponen costes elevados, por lo que la búsqueda de presas alternativas de tamaño y calidad nutricional adecuados sigue siendo una prioridad en la actualidad. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se plantean los siguientes objetivos:

- Evaluar el potencial de la especie *E. rapax* como método de control biológico del monogeneo *N. melleni* en el cultivo del medregal (*S. dumerili*), mediante la realización de experimentos de seguimiento de depredación del anfípodo sobre los huevos del parásito.
- Evaluar el potencial de *E. rapax* como presa viva alternativa para alimentación larvaria en sistemas acuícolas, mediante el análisis del contenido de omega-3 LC-PUFA; EPA y DHA, tanto en los anfípodos experimentales como en anfípodos salvajes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar el potencial depredador del anfípodo *E. rapax* sobre los huevos del parásito *N. melleni*, se llevó a cabo un estudio compuesto por tres experimentos. Estos experimentos se diseñaron secuencialmente para obtener evidencias y datos preliminares que permitieran establecer el diseño experimental más adecuado en cada caso. Se utilizaron individuos de la especie *E. rapax* procedentes del acuario habilitado en el IEO de Santa Cruz de Tenerife para el mantenimiento de estos organismos (Figura 4) y se transportaron en un recipiente adecuado al laboratorio INMAR de la sección de biología de la ULL. Allí se habilitó otro acuario con un aireador para oxigenar el agua, algas y piedras para proporcionar refugio a los anfípodos (Figura 5). El acuario se mantuvo a una temperatura de entre 18-19°C y una salinidad de 37,9 PSU. Los anfípodos utilizados para los distintos ensayos fueron extraídos de este acuario, donde de forma natural, se iban desarrollando y reproduciendo. Para ello, se separaba en una placa de Petri y observaba bajo lupa un conjunto de individuos, seleccionando aquellos que presentaban un rango de talla similar.

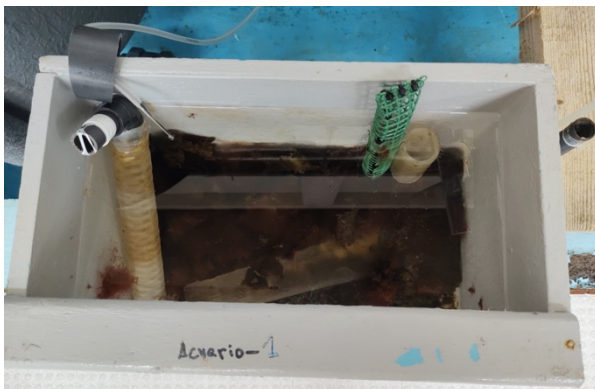


Figura 4. Acuario del IEO que contiene *E. rapax*, junto con algas y objetos como tubos y mallas que les permiten refugiarse.

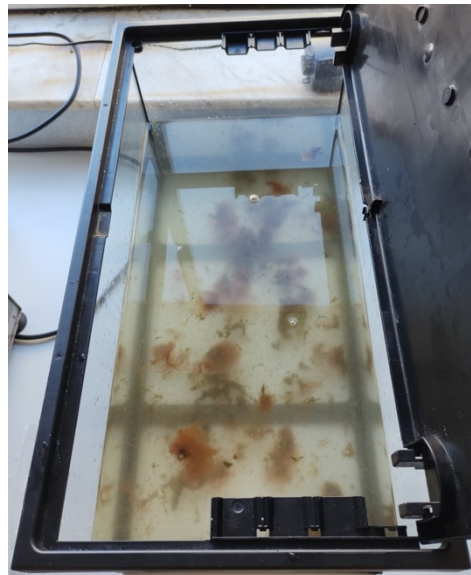


Figura 5. Acuario habilitado en el laboratorio INMAR (ULL) con los anfípodos procedentes del IEO.

Por otra parte, los huevos del parásito *N. melleni*, también fueron capturados en el IEO. Su recolección se realizó en tanques de fibra de vidrio de 1000 litros situados en el interior de las instalaciones que contenían individuos de la especie *S. aurata* infectados por el parásito. Para ello,

se utilizó el dispositivo mencionado anteriormente que consiste en la colocación de discos de nylon de 65 mm de diámetro y una luz de malla de 1500 μm sujetos a un soporte lineal (Figuras 6 y 7). Estos discos se sumergen en el tanque cerca del desagüe superficial, donde se recolectan los huevos que quedan enganchados en la malla debido a sus apéndices filamentosos (Cejas *et al.*, 2014).



Figura 6. Soporte lineal que se coloca en el tanque donde se fija la malla de nylon en la que quedan enganchados los huevos.

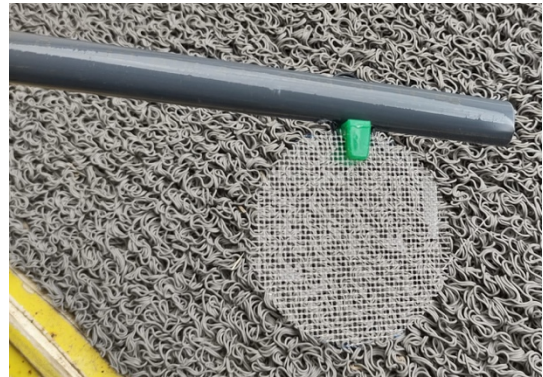


Figura 7. Malla de nylon que queda sumergida en el tanque.

Después de 48 horas se retiraban las mallas del tanque, se disponían en placas de Petri con agua de mar filtrada y etiquetaban (Figura 8) para ser transportadas a las instalaciones de la ULL.



Figura 8. Preparación de las placas de Petri con agua de mar filtrada antes de la extracción de las mallas del tanque.

De manera preliminar se realizaron observaciones exhaustivas bajo lupa, de huevos y anfípodos, con el fin de verificar visualmente la ingesta por parte *E. rapax* de los huevos de *N. melleni*. Posteriormente, se procedió al diseño y ejecución de diversos ensayos.

A continuación, se describen las características de cada experimento, destacando las modificaciones implementadas en cada etapa para optimizar el estudio.

3.1 Primer experimento

3.1.1 Preparación de placas

Se prepararon 8 placas de Petri, la mitad de las cuales se utilizaron como control (con huevos y sin anfípodos) y la otra mitad como experimentales (con huevos y anfípodos), con una media de 408 ± 21 huevos. En cada placa experimental se añadieron 4 anfípodos, utilizando un total de 16 individuos.

3.1.2 Mantenimiento de las placas

Las placas se mantuvieron en el laboratorio INMAR de Biología Marina a una temperatura ambiente aproximada de 18°C (Figura 9). Se dejaron ligeramente abiertas para que hubiera un mejor intercambio de oxígeno con el ambiente y evitar la anoxia.



Figura 9. Placas que contienen las muestras de huevos y anfípodos situadas en una mesa del laboratorio INMAR.

3.1.3 Recuento de huevos

Mediante la lupa binocular se hizo un recuento de huevos los días 0, 3, 4, 5, 7 y 10 de experimento. El recuento consistió en hacer un barrido de cada placa, bajo la lupa, para contar los huevos presentes en cada rejilla. Se estableció un criterio para homogeneizar los recuentos,

considerando como huevos enteros, y, por lo tanto, contables, aquellos que conservaban como mínimo un 80% de su estructura original, mientras que los que conservaban un porcentaje inferior debido a las mordeduras recibidas por parte de los anfípodos se consideraban comidos y no se incluían en el recuento. Siguiendo este criterio, también se consideraban como huevos enteros aquellos que ya habían eclosionado y presentaban una pequeña apertura en un vértice (Figura 10). Los resultados se apuntaron diariamente en la libreta del estudio, donde también se añadieron observaciones.



Figura 10. Huevo eclosionado. El oncomiracidio sale del huevo por una apertura en uno de los vértices.

3.1.4 Manejo de anfípodos muertos

Cuando se empezaron a detectar individuos muertos en las placas, estos se recolectaron en un tubo Eppendorf etiquetado que se conservó en el ultracongelador (-80 °C). La recolección se hacía de manera inmediata, de esta forma los ejemplares eran conservados en buen estado para la realización de análisis lipídicos posteriores. Una vez el 50% de los anfípodos morían, se paraba el experimento.

3.2 Segundo experimento

3.2.1 Preparación de placas

Se prepararon 8 placas de Petri, la mitad de las cuales se utilizaron como control (con huevos y sin anfípodos) y la otra mitad como experimentales (con huevos y anfípodos), con una

media de 558 ± 50 huevos. En cada placa experimental se añadieron 4 anfípodos, utilizando un total de 16 individuos.

3.2.2 Recuento de huevos

El procedimiento de recuento fue el mismo que el utilizado en el Experimento 1, ahora bien, en este caso el recuento se realizó a diario, incluyendo los fines de semana.

Para el mantenimiento de las placas, el recuento de huevos y el manejo de individuos muertos, se siguieron los mismos procedimientos descritos en el primer ensayo.

3.3 Tercer experimento

3.3.1 Preparación de placas

En el presente experimento se realizaron ciertos ajustes destinados a disminuir la carga y la variabilidad en el número de huevos inicial de cada disco. Así, se solicitó al personal del IEO que se nos proporcionara un número mayor de discos, y a dos tiempos de exposición en el tanque infectado de dorada, inferiores a las 48h de los ensayos previos. Se obtuvieron así 20 placas con huevos de las cuales, 10 habían sido mantenidas en el interior del tanque durante 24 horas (placas 1.1 a 1.10) y las 10 restantes durante solo 5 horas (placas 2.1 a 2.10). Después del recuento de cada malla, se eligieron las placas 1.1, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 y 1.10, que habían sido dejadas en el interior del tanque durante 24 horas, y la placa 2.8, que estuvo expuesta 5 horas. En este experimento, se montaron solo estas 10 placas de Petri experimentales con huevos en todas ellas (115 ± 15) y 2 anfípodos por placa, siendo el número total de anfípodos 20, y prescindiéndose del grupo control, al no observarse en los ensayos previos degradación ni variación en el número de huevos, en ausencia de anfípodos.

3.3.2 Mantenimiento

Las placas se mantuvieron durante todo el experimento en una sala con una temperatura estable de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 11). También se aplicó un fotoperiodo de 24 h de oscuridad para simular las condiciones de penumbra en las que se suelen encontrar los anfípodos en el medio natural. Para

ello se usó una caja de cartón perforada en la parte superior (Figura 12). Con estas condiciones se pretendía aumentar la supervivencia de los anfípodos en las placas.

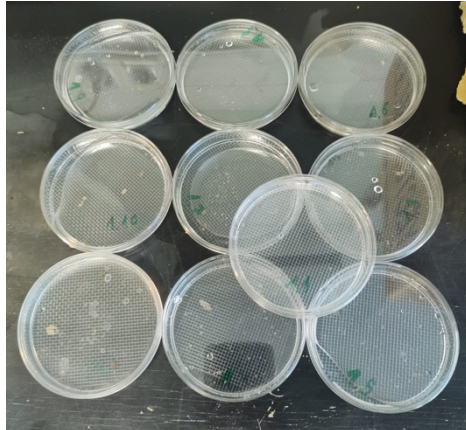


Figura 11. Disposición de las placas del experimento 3.



Figura 12. Caja de cartón cubriendo las placas para proporcionar a los anfípodos un ambiente de refugio.

Para prevenir daños debidos a la evaporación y consecuentemente, un aumento de la salinidad, se observó el nivel de agua en las placas diariamente y se llevó a cabo una renovación de esta cuando fue necesario.

Para el recuento de huevos y el manejo de individuos muertos se siguieron los mismos procedimientos descritos en los experimentos anteriores.

3.4 Análisis lipídico

Para evaluar la idoneidad nutricional de los anfípodos como presa viva alternativa para larvas de especies de interés acuícola se procedió a realizar unos análisis preliminares del contenido lipídico y el perfil de ácidos grasos de los individuos recolectados de las placas de Petri experimentales, y de individuos salvajes.

3.4.1 Extracción lipídica

La extracción lipídica se realizó siguiendo el método de Folch *et al.* (1957) modificado por Christie y Han (2010). Se llevaron a cabo 6 extracciones, 3 para los anfípodos de cada uno de los 3 experimentos y otras 3 extracciones de individuos salvajes. Para cada extracción y debido al

reducido tamaño de los anfípodos, se realizó un pool de todos los individuos de cada uno de los experimentos y 3 pools de individuos salvajes.

Muy brevemente, cada muestra se homogeneizó con 8 ml de cloroformo metanol (CL:MET) (2:1, v/v) mediante un homogeneizador eléctrico (CASALS, Girona, España), y se filtró mediante un embudo para eliminar los restos sólidos restantes. En un nuevo tubo se recuperó todo el contenido lipídico y el resto de los compuestos liposolubles. Se añadieron 2 ml de cloruro potásico (KCL) al 0,88% para aumentar la tensión superficial entre las fases. Se agitaron los tubos con el Vórtex (Figura 13) y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos. La fase inferior que contenía los lípidos fue extraída y trasvasada a un nuevo tubo. Se evaporó el solvente (CL:MET) mediante el vaporizador de nitrógeno (Figura 14). El extracto lipídico se resuspendió en cloroformo metanol y se pasó a viales previamente pesados. Se evaporó el solvente nuevamente y se mantuvieron los viales en una cámara de vacío en condiciones de oscuridad durante 12 horas. Pasado este tiempo, se pesaron los viales y se obtuvo el peso del extracto de lípido seco calculando la diferencia con el peso del vial vacío. Por último, el extracto de lípido total (LT) se redisolvió con cloroformo: metanol 2:1, con butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante y a una concentración de 10 mg/ml. Se sellaron los viales con nitrógeno para evitar la peroxidación lipídica y se conservaron en el congelador a -20°C. Todos los pasos anteriores se realizaron en presencia de hielo para minimizar la modificación del perfil lipídico de las muestras por acción de las lipasas.

Para calcular el porcentaje de lípido fresco se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lípido total peso fresco} = \frac{LT \text{ (mg)}}{\text{peso fresco de la muestra (mg)}} \times 100$$



Figura 13. Agitación de un tubo en el Vórtex.



Figura 14. Evaporación del solvente mediante el vaporizador de nitrógeno.

3.4.2 Determinación del perfil de ácidos grasos

Para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos o 'FAMES' (del inglés, *Fatty Acid Methyl Esters*) se transmetiló 1 mg de cada extracto lipídico obtenido anteriormente. Se le añadió un 5% del ácido graso conocido (19:0), como estándar interno, así como 1 ml de tolueno y 2 ml de ácido sulfúrico al 1% en metanol. Se incubaron las muestras en una manta calefactora a 50°C durante 16 horas, en atmósfera de nitrógeno y oscuridad. Concluido este tiempo, en cada tubo se añadieron 2 ml de bicarbonato potásico (KHCO₃) al 2%, 5 ml de hexano dietil éter (1:1 ml) con BHT al 0,01%, se agitaron y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se formaron dos fases, siendo la superior la que contenía los FAMES. Se extrajo la fase superior y se transfirió a nuevos tubos (Figura 15). Para asegurar la recolección de todos los ésteres metílicos se realizó un segundo lavado del tubo con 3 ml de hexano dietil éter sin BHT. Se evaporó el solvente con nitrógeno y se resuspendió cada muestra con 100 µl de hexano.

Para el aislamiento y la purificación de los FAMES se realizó una cromatografía en capa fina o 'TLC' (del inglés, *Thin Layer Chromatography*). Se emplearon placas de sílice de 20 x 20 cm

de largo y 0,25 cm de ancho (Macherey-Nágel, Düren, Alemania) donde se aplicaron las muestras transmetiladas y aisladas. Para el desarrollo de la fase móvil se preparó una solución de hexano, éter y ácido acético (90:10:1 ml). Una vez desarrolladas las placas, se tiñó con iodina (1% iodo en cloroformo) la banda perteneciente a los FAMES de estándar externo aplicado en la misma placa junto con las muestras. Las manchas obtenidas permitieron delimitar así las zonas correspondientes a los FAMES purificados de las muestras. Se raspó la sílice de cada zona con una espátula metálica y se recuperó cada muestra en un tubo de ensayo, donde se añadieron 8 ml de hexano éter sin BHT y 2 ml de hexano éter con BHT al 0,01%. Para precipitar la sílice sobrante se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 5 minutos. Se extrajo la parte superior que contenía los FAMES purificados, se evaporó el solvente, se resuspendieron las muestras en hexano y se almacenaron en el congelador a -20°C.

Para determinar el perfil de ácidos grasos se hizo una cromatografía de gases de las muestras de FAMES. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Thermo Scientific TRACE-GC Ultra, Milán, Italia), con inyección en columna y un detector de ionización de llama (FID), en una columna de sílice fundida y empleando helio como gas portador. Para interpretar los resultados obtenidos con el cromatógrafo, se compararon los tiempos de retención de cada ácido graso con los de un patrón compuesto por una mezcla de aceite de pescado y varios multiestándares comerciales de composición conocida. Los valores obtenidos se representaron como la proporción relativa de cada ácido graso respecto al total de ácidos grasos.



Figura 15. Extracción y transferencia de la fase superior de los tubos para la obtención de los FAMES.

3.4 Análisis de datos

Para determinar el consumo de huevos por anfípodo se dividió el valor de huevos consumidos en las placas entre el número de individuos que estaban vivos en las mismas. Posteriormente se aplicó el test de Friedman para evaluar si hubo efecto del factor día en medidas intrasujeto, es decir, en el consumo de huevos por anfípodo ($P\text{-valor} < 0,05$). Cuando las diferencias fueron significativas se realizó un análisis post-hoc usando el estadístico de Wilcoxon para determinar las diferencias entre cada día ($P\text{-valor} < 0,1$).

Por otra parte, se realizó una prueba T- de Student para determinar si existían diferencias significativas de cada ácido graso o índice lipídico entre el grupo de anfípodos experimentales y el grupo de anfípodos salvajes ($P\text{-valor} < 0,05$). Para llevar a cabo este análisis estadístico, se confirmó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk. Para las variables que no cumplían la hipótesis de normalidad se aplicaron las transformaciones del arcoseno y la inversa.

El estudio estadístico se llevó a cabo con el software IBM SPSS Statistics 25.0.

4. RESULTADOS

Como se señaló en el apartado de material y métodos, previamente al planteamiento del primer experimento se observó el comportamiento de los anfípodos en la placa. Cuando se obtuvieron evidencias del consumo de un huevo (Figura 16), se procedió con el primer experimento.



Figura 16. Anfípodo manipulando e ingiriendo un huevo.

Los grupos control con los que se trabajó durante el primer y segundo experimento no presentaron variaciones en cuanto al número de huevos por placa, más allá de pequeñas oscilaciones debidas a posibles errores en el conteo. Por este motivo, en los datos mostrados a continuación, no se representan los datos de los grupos control.

En la Figura 17 se muestra la mortalidad de anfípodos en cada experimento. Se puede observar que el mayor número de muertes se produjo en el segundo experimento, alcanzando cifras superiores al 50% el séptimo día del experimento, mientras que en el primero se alcanzó el 50% en el día 10 y en el tercero el día 12. En los tres experimentos hubo una baja mortalidad durante los primeros días, y mientras que en el experimento 2 empezó a aumentar a los 5 días, en los otros experimentos se produjo el aumento durante los últimos días (del 9 al 12).

Mortalidad de anfípodos (valor acumulado)

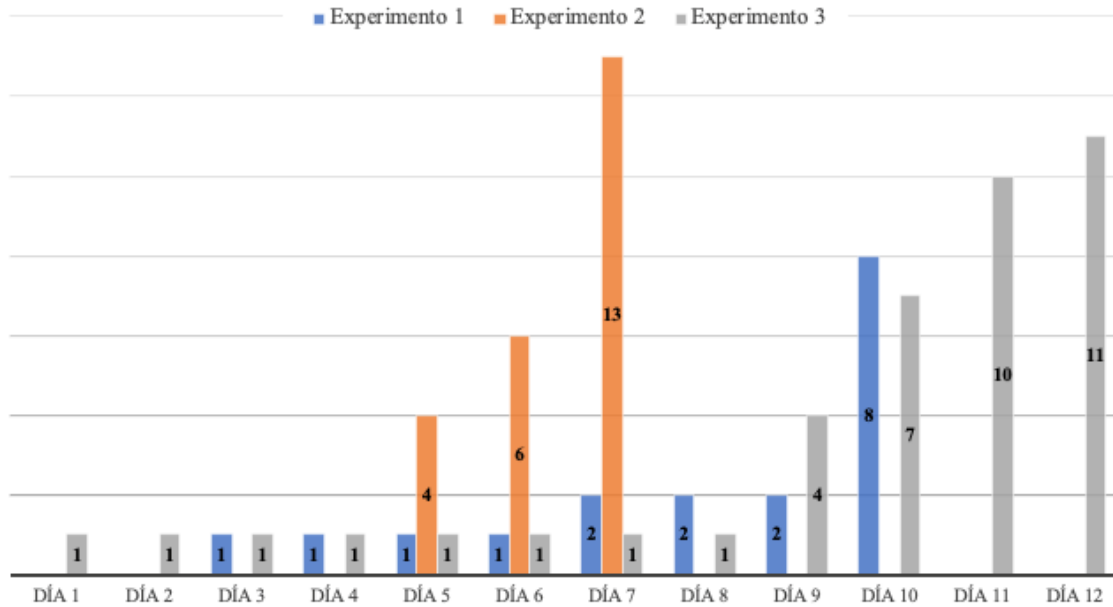


Figura 17. Representación gráfica de la mortalidad de anfípodos por experimento (valor acumulado).

4.1 Primer experimento

El primer experimento tuvo una duración de 10 días. Como se puede observar en la Figura 18, el mayor consumo de huevos se produjo durante los 4 primeros días de experimentación, presentando diferencias significativas, comparado con el consumo de huevos del día 7, en el que se registró el menor consumo.

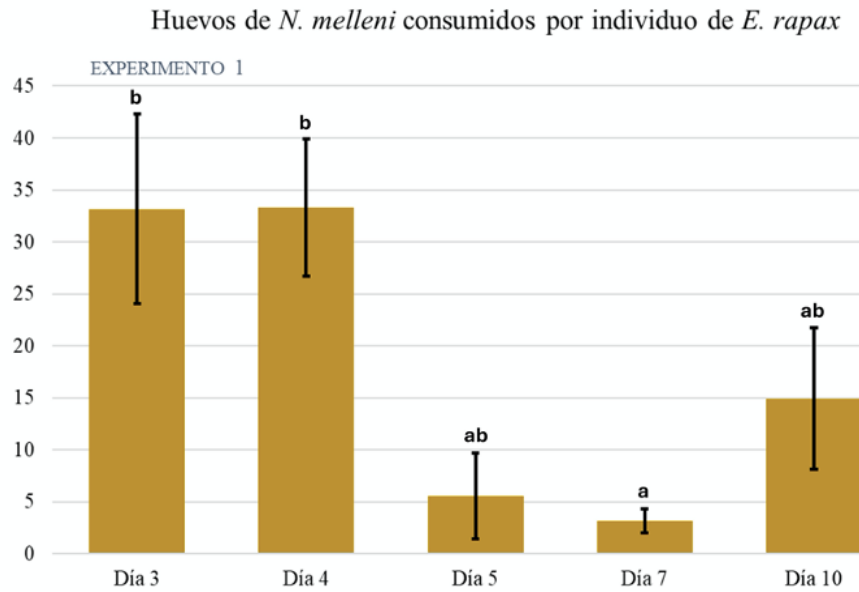


Figura 18. Representación gráfica del número de huevos de *N. melleni* consumidos en cada muestreo por individuo de *E. rapax* en el primer experimento realizado. Media \pm error estándar ($n=4$). Diferentes letras indican diferencias significativas (p -valor $< 0,1$).

4.2 Segundo experimento

El segundo experimento tuvo una duración de 7 días (3 días menos que el primero) debido a la alta mortalidad de anfípodos detectada el último día. Como se puede observar en la Figura 19, el consumo de huevos se produjo de forma irregular. El primer día se detectó el mayor consumo de huevos por anfípodo, con una diferencia significativa respecto a los días 2 y 6, cuando se observó el menor consumo.

Huevos de *N. melleni* consumidos por individuo de *E. rapax*

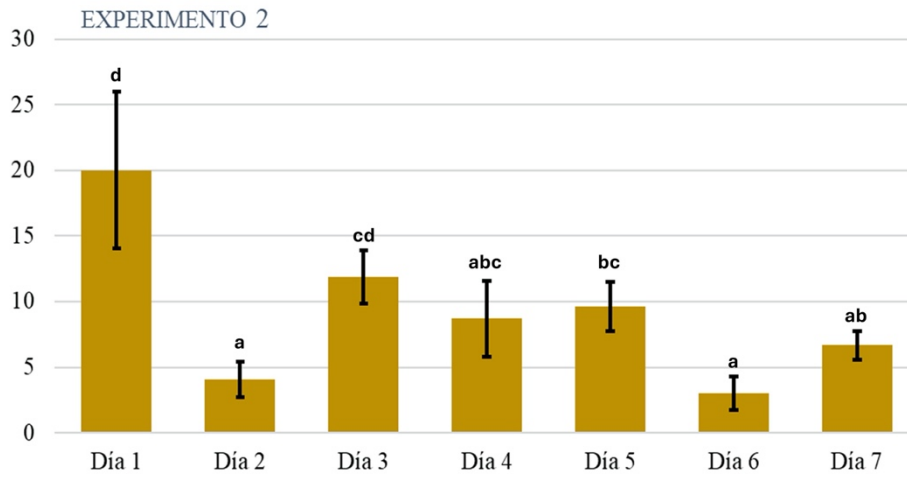


Figura 19. Representación gráfica del número de huevos de *N. melleni* consumidos diariamente por individuo de *E. rapax* en el segundo experimento realizado. Media \pm error estándar ($n=4$). Diferentes letras indican diferencias significativas (p -valor $< 0,1$).

4.3 Tercer experimento

El tercer experimento tuvo una duración de 12 días, superior a la de los experimentos anteriores. Como se puede observar en la Figura 20, la mayor ingesta de huevos por anfípodo fue el primer día, mientras que los días 5 y 7 presentaron el menor consumo.

Huevos de *N. melleni* consumidos por individuo de *E. rapax*

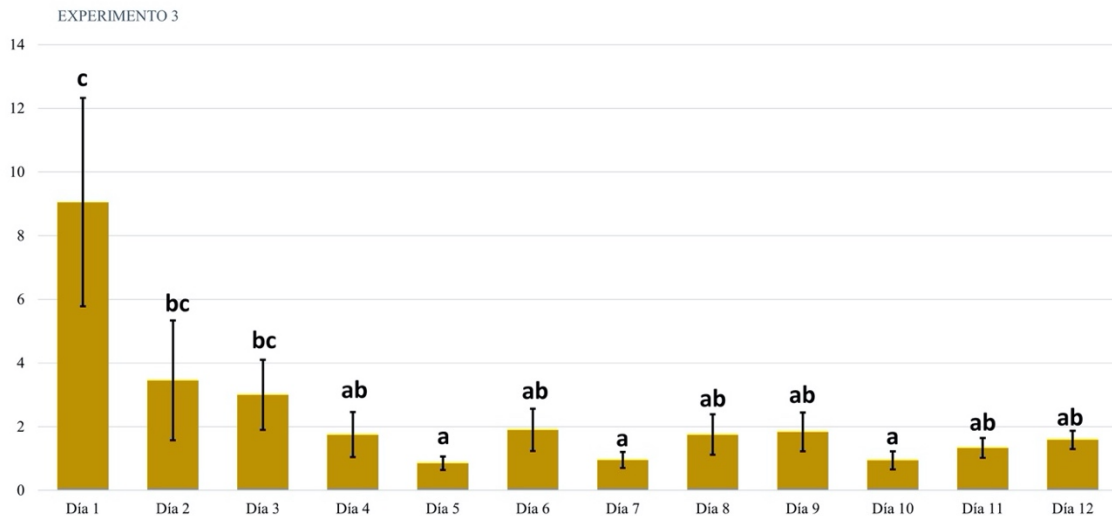


Figura 20. Representación gráfica del número de huevos de *N. melleni* consumidos diariamente por individuo de *E. rapax* en el segundo experimento realizado. Media \pm error estándar ($n=10$). Diferentes letras indican diferencias significativas (p -valor $< 0,1$).

4.4 Contenido lipídico y perfil de ácidos grasos

En la Tabla 2 se puede observar que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de lípido total ni en el contenido total de ácidos grasos, entre los individuos cultivados y salvajes.

Sin embargo, sí se detectan diferencias específicas en la mayoría de los ácidos grasos que se reflejan también en los sumatorios correspondientes. Así, los ácidos grasos saturados (SFA) más relevantes fueron el ácido palmítico (16:0) y el ácido esteárico (18:0). Ambos fueron más abundantes en los individuos procedentes de los experimentos.

En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), los anfípodos sometidos a los experimentos aumentaron los niveles de 16:1 (n-9) y 18:1 (n-9) respecto a los individuos salvajes.

Por otra parte, destacan las diferencias en el contenido de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), siendo mayor en los anfípodos salvajes. Concretamente destacan los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) más relevantes fisiológicamente como son el ARA (20:4 (n-6)), EPA (20:5 (n-3)) y DHA (22:6 (n-3)). Además, el DPA (22:5 (n-3)) presentó unos valores muy superiores al doble en los anfípodos salvajes comparado con los de los experimentos.

	Experimentos	Salvajes	Dif.
LT (% p.f.)	0,86 ± 0,25	0,74 ± 0,18	
∑ AG (ug/mg)	2,05 ± 0,30	2,28 ± 0,19	
16:0	26,75 ± 4,14	17,91 ± 0,12	*
18:0	11,43 ± 1,27	7,39 ± 0,06	*
∑ SFA	41,33 ± 5,64	27,98 ± 0,34	*
16:1 (n-9)	0,86 ± 0,32	0,34 ± 0,05	*
16:1 (n-7)	1,26 ± 0,46	1,36 ± 0,26	
18:1 (n-9)	22,16 ± 2,14	17,53 ± 0,53	*
18:1 (n-7)	2,80 ± 1,12	3,06 ± 0,12	
20:1 (n-9)	1,43 ± 0,06	1,59 ± 0,12	
∑ MUFA	29,55 ± 4,27	24,10 ± 0,32	
18:2 (n-6)	3,47 ± 1,42	3,68 ± 0,42	
18:3 (n-3)	0,67 ± 0,17	1,87 ± 0,41	*
18:4 (n-3)	0,12 ± 0,21	0,41 ± 0,04	
20:3 (n-6)	0,12 ± 0,20	0,32 ± 0,05	
20:4 (n-6)	4,42 ± 0,11	7,58 ± 0,28	*
20:4 (n-3)	0,13 ± 0,23	0,25 ± 0,23	
20:5 (n-3)	8,77 ± 0,50	16,19 ± 1,04	*
22:5 (n-6)	0,51 ± 0,09	0,72 ± 0,01	*
22:5 (n-3)	0,19 ± 0,17	0,97 ± 0,28	*
22:6 (n-3)	5,35 ± 0,74	7,76 ± 0,75	*
∑ PUFA	24,60 ± 2,26	41,86 ± 0,47	*
∑ LC-PUFA	20,00 ± 1,15	35,51 ± 1,13	*
∑ DMA	2,09 ± 0,29	3,29 ± 0,09	*
∑ UK	2,42 ± 0,89	2,77 ± 0,17	

Tabla 2. Valores de lípido total (% p.f.) y contenido total de ácidos grasos (ug/mg). Proporción relativa de cada ácido graso respecto al total (%). Media ± error estándar. * Indica diferencias significativas (p-valor < 0,1).

5. DISCUSIÓN

Este estudio confirma el potencial de *E. rapax* para depredar sobre los huevos de *N. melleni*, sugiriendo su posible uso como método de control biológico contra los parásitos monogeneos.

Los anfípodos son el grupo de crustáceos más diverso en cuanto a estilos de vida, tipos tróficos, hábitats y medidas (Hernández, 2016). Constituyen uno de los grupos dominantes en los hábitats marinos rocosos y los fondos blandos, donde tienen un importante rol ecológico y son un punto de unión entre la producción primaria, la secundaria y los niveles tróficos superiores (Guerra-García *et al.*, 2014).

Estos organismos presentan una alta diversidad de hábitos alimenticios, que incluyen la ingesta de detritus, bacterias, hongos, presas vivas y restos de animales y plantas (Conradi y Cervera, 1995). Los resultados obtenidos en este estudio se pueden relacionar con el oportunismo característico de este grupo, ya que la capacidad que tienen los anfípodos para manipular distintos tipos de alimento los convierte en candidatos ideales para los experimentos realizados. Además de los indicios observados en los conteos de huevos, también se documentó un anfípodo manipulando, masticando e ingiriendo un huevo.

En el primer experimento realizado, se observó una evidencia del consumo de huevos, especialmente durante los primeros días. En los recuentos posteriores, se notó que la tendencia a la ingesta de huevos continuaba, aunque en menor medida que en los días iniciales. El tiempo de eclosión de los huevos es variable y uno de los factores que influye en esta variabilidad es la temperatura. El mayor éxito de eclosión (80 %) se produce cuando la temperatura está entre los 18 y los 30°C, mientras que a 16°C y a 32°C no se produce eclosión (Valles *et al.*, 2019). A temperaturas entre 24°C y 30°C, el tiempo de eclosión puede ser de 4 a 5 días, pero a temperaturas inferiores (22°C) este tiempo puede llegar a extenderse a más de 7 días (Hoai y Hutson, 2014; Valles *et al.*, 2019).

Podría existir una relación entre el tiempo de eclosión de los huevos y el hecho de que los anfípodos los consumieran mayoritariamente durante los primeros días de estudio (Figura 18 y Figura 20). Sería interesante investigar si los anfípodos son capaces de diferenciar entre los huevos sin eclosionar y los huevos eclosionados, y determinar si, en caso de que lo hagan, el motivo de la disminución de la ingesta pasados unos días, es que el huevo les aporta más nutrientes antes de la eclosión.

Después de realizar el primer experimento y confirmar la interacción entre los anfípodos y los huevos, se observó que los valores obtenidos en los conteos realizados únicamente durante los días elegidos eran muy variables. Para tratar de entender esta variabilidad, se decidió realizar conteos diarios en los experimentos posteriores.

En el segundo experimento se utilizaron placas con una media de 558 ± 50 huevos por placa. Este experimento contó con la mayor cantidad de huevos, lo que no pasó desapercibido, ya que los recuentos presentaron mayor dificultad e implicaron más tiempo. Además de los huevos, en las placas también había una cantidad considerable de materia orgánica procedente del tanque inicial. A lo largo del experimento, junto con los exoesqueletos de los anfípodos y sus secreciones mucosas, se generaron agrupaciones de huevos y materia orgánica que dificultaron el conteo.

A esta dificultad se sumó la ola de calor que se produjo durante los días 4 y 5 del experimento. Durante esos días, las temperaturas en San Cristóbal de La Laguna registraron una media de $26,3^{\circ}\text{C}$, alcanzando picos de 31°C (Meteostat, 2024). Estresores ambientales como el aumento de la temperatura, el bajo oxígeno y la limitación de alimento impactan la salud de los organismos, reduciendo progresivamente su reproducción, crecimiento, actividad y, en última instancia, su supervivencia (Semsar-kazerouni *et al.*, 2020). Estos estresores pueden influir significativamente en el balance energético de los organismos debido al requerimiento adicional de energía para restablecer y mantener la homeostasis, lo que puede poner a prueba los sistemas de adquisición, transformación y conservación de energía (Vereshchagina *et al.*, 2016). Así, en este experimento se pudo corroborar que el aumento de la temperatura y el subsecuente aumento de la salinidad en las placas afectaron la supervivencia de los anfípodos, alcanzando una mortandad superior al 80% en tan solo 3 días (Figura 17).

Para optimizar el estudio y tratar de obtener una mayor supervivencia de los anfípodos, en el tercer experimento se realizaron cambios metodológicos que permitieron tener un mayor control sobre la temperatura y el fotoperiodo. Las placas se mantuvieron a una temperatura estable de 20°C, eliminando así posibles variaciones de temperatura y la consecuente evaporación de agua. La mayoría de los organismos han desarrollado un reloj interno que regula los ritmos circadianos de su metabolismo, fisiología y comportamiento. En un estudio realizado por Lefei Jiao *et al.* (2022) con el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), se observó que la exposición continua a la oscuridad alteraba el metabolismo del hepatopáncreas (importante para la digestión, absorción y metabolismo de los nutrientes) y la homeostasis de la microbiota intestinal. También se observó la reducción en la expresión de algunos genes involucrados en la determinación del color del cuerpo, el ritmo diurno, la función inmunológica y los niveles hormonales.

Por otra parte, se cree que tanto la temperatura como el fotoperiodo controlan la diapausa en varios anfípodos marinos, entendiendo este proceso como el fenómeno fisiológico de inactividad para sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables (Steele, 1967). En el caso del anfípodo *Hyaella azteca*, se detectó que el fotoperíodo es la principal señal de inducción y terminación de la reproducción, y se demostró que con un fotoperíodo de pocas horas de luz (8 horas) el anfípodo entraba en una fase de reposo reproductivo (De March, 1976). Por consiguiente, se planteó aplicar un fotoperíodo de 24 horas de oscuridad en el tercer experimento para tratar de disminuir el estrés en los anfípodos y aumentar su supervivencia.

Los resultados obtenidos con estas modificaciones fueron satisfactorios, en el sentido de que la supervivencia fue superior a la de los otros experimentos, llegando a una duración de 12 días. Al extraer la caja que cubría las placas para proceder al conteo de huevos, se pudo observar que los anfípodos presentaban muy poca actividad y no comenzaban a moverse hasta ser expuestos a la luz de la lupa. Además, el consumo de huevos por anfípodo en el tercer experimento fue el más bajo de entre los tres ensayos ($2,37 \pm 0,65$), lo que sugiere que las modificaciones realizadas disminuyeron el metabolismo de los anfípodos, reduciendo su gasto energético y favoreciendo su supervivencia. Sin embargo, la menor actividad generó también un menor grado de depredación sobre el parásito.

En este sentido, la mortalidad observada en los 3 experimentos podría deberse al agotamiento del oxígeno disuelto en la placa, a los cambios bruscos de temperatura, al aumento de la salinidad o a la falta de alimento. Es posible que los huevos no sean suficientemente nutritivos para asegurar una supervivencia duradera en *E. rapax* y que, pasados unos días, se vean debilitados. Para resolver esta cuestión, sería interesante plantear ensayos controlando de forma más estricta los factores mencionados y realizar un perfil nutricional de los huevos de *N. melleni* para estudiar su composición.

En cuanto al estudio del contenido lipídico y el perfil de ácidos grasos, cabe destacar cómo, las condiciones de cultivo, en donde la única fuente de alimento para el anfípodo fue el propio huevo del parásito, fueran probablemente también el origen de una disminución de LC-PUFA, y en particular de EPA, de los individuos cultivados frente a los salvajes. No obstante, es destacable también el alto contenido de estos ácidos grasos en ambos grupos de *E. rapax*, analizados, siendo los más relevantes 20:4 (n-6) (ARA), 20:5 (n-3) (EPA) y 22:6 (n-3) (DHA). Algunos invertebrados marinos tienen la capacidad de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Kabeya *et al.*, 2018). Esta capacidad metabólica, junto con su hábito de alimentación detritívoro convierte a ciertas especies en candidatos ideales para, a través del reciclaje de materiales de desecho de bajo valor nutricional procedentes de bioindustrias, producir una biomasa altamente nutritiva que se pueda utilizar como una nueva fuente sostenible de ácidos grasos.

Algunos grupos de interés son los anélidos poliquetos y los crustáceos gammáridos y copépodos (Navarro *et al.*, 2021). Entre otros, también se han estudiado especies de gasterópodos como *Phyllonotus pomum* y *Chicoreus brevifrons* (D'Armas *et al.*, 2010), y crustáceos como los cangrejos *Eriocheir sinensis* y *Carcinus maenas*, o la langosta *Homarus vulgaris*, todos ellos con elevadas concentraciones de LC-PUFA (Chapelle, 1977).

En este sentido, la diferencia de composición observada se podría explicar tanto por la ausencia de algas ricas en LC-PUFA en su entorno, durante la fase de experimentación como por una disminución en la biosíntesis de estos ácidos grasos en los individuos sometidos al experimento por la ausencia de sus ácidos precursores en la dieta como el 18:3n-3 (ALA) en el caso del EPA y DHA, y del 18:2n-6 (LA) para la síntesis del ARA, aportados en muchos casos por las propias

algas de su dieta. Numerosas especies de crustáceos tienen la habilidad de biosintetizar ácidos grasos LC-PUFA, lo cual se podría relacionar con la baja calidad del alimento disponible en los hábitats ricos en detritus (Monroig *et al.*, 2013). Además, se ha observado que algunas especies de crustáceos expresan una incluso enzima desaturasa n-3 (o $\Delta 15$), más propia de organismos fotosintéticos y que cataliza la interconversión de ácidos grasos n-6 a n-3, permitiendo incluso la síntesis de LC-PUFAs como EPA y DHA a partir de 18:2n-6 (Monroig *et al.*, 2013).

Sin embargo, existe poca bibliografía sobre *E. rapax* en cuanto a esta cuestión, por lo que no se sabe con certeza si el metabolismo lipídico de los individuos sometidos al experimento se habría visto disminuido por alguna razón específica. En cuanto a la hipótesis relacionada con las algas, es sabido que las algas son capaces de producir ácidos grasos *de novo* y son, por excelencia, la mayor fuente de LC-PUFAs, de la cual se alimentan tanto otros organismos acuáticos como los humanos (Hardwood, 2019). Por lo tanto, el mayor contenido de LC-PUFAs en los individuos que estuvieron en el acuario con algas durante toda la duración del estudio podría deberse a su alimentación a base de estas algas.

Podría ser interesante en el futuro plantear experimentos en tanques de cultivo de sistemas multitróficos y tratar de aprovechar el crecimiento de algas como *Ulva rigida*, *Dictyota dichotoma* y *Enteromorpha intestinalis*, reconocidas como algas de preferencia para los anfípodos *Elasmopus pecteniscrus* y *Elasmopus levis* respectivamente (Hernández *et al.*, 2016) en *E. rapax* y otros anfípodos presentes en los tanques de cultivo depredando sobre parásitos monogéneos. En esta misma línea de investigación, en Alicante se ha estudiado el uso de anfípodos como innovación para el reciclado de nutrientes en acuicultura multitrófica dentro del Proyecto Airam, incluido en el Programa Pleamar. (Pleamar, 2022).

Los anfípodos ya han sido investigados en otros casos, por su interés como presa viva en acuicultura. Un ejemplo es el uso en el cultivo de cefalópodos, concretamente para pulpo rojo (*Octopus maya*) y sepia (*Sepia officinalis*). En estos estudios se vio que los juveniles alimentados con anfípodos gammáridos llegaron a doblar el peso final respecto a los que habían sido alimentados con artemia (Baeza-Rojano, 2012).

El éxito de la producción de larvas y alevines de peces y cefalópodos depende de un suministro de alimento vivo adecuado y es de los retos a los que se enfrenta la acuicultura. Comúnmente se han utilizado el rotífero *Brachionus plicatilis* y el crustáceo braquiópodo *Artemia* para esta fase de la alimentación, sin embargo, no siempre permiten un buen crecimiento, ya que se producen problemas relacionados con la talla inapropiada y la deficiencia nutricional de estas presas (Jiménez, 2018). Estas presas son deficientes en LC-PUFAs de forma natural, por lo que es necesario enriquecerlas con productos ricos en estos compuestos antes de suministrarlos a las larvas (Rodrigues-Filho, 2010). Este enriquecimiento supone un gasto económico añadido, por lo que es interesante contemplar otro tipo de alimentación. Jiménez *et al.* (2021) estudiaron distintas dietas para alimentar al gámmárido *Gammarus insensibilis* y concluyeron que de entre las dietas testadas, los tratamientos con detritus y *Ulva* presentaron los valores más altos de ácidos grasos ARA, EPA y DHA frente a los que presentaron los tratamientos con *Artemia* y fitoplancton. Además, se reducirían tanto el coste económico como el esfuerzo, ya que tanto los detritus como la *Ulva* se pueden obtener de forma natural creciendo en las instalaciones de cultivo, sin necesidad de un cultivo añadido, al mismo tiempo que su eliminación del medio sería positiva para el ambiente. Jiménez (2018) realizó un estudio en el que se cultivó *Seriola dumerili* en época de destete junto con el anfípodo *Gammarus insensibilis* y se demostró que las larvas del pez alcanzaron altos valores de PUFAs (LA, ALA, ARA, EPA y DHA), con un incremento en la supervivencia y una reducción de los problemas asociados a la contaminación de los tanques de cultivo (Jiménez, 2018).

Así pues, sería interesante investigar más sobre el tipo de dietas que podrían aportar una mayor cantidad de PUFAs a *E. rapax* y probar su uso, tanto como presa viva como en forma inerte, para la alimentación de larvas de peces y como sustitutivo de otras presas vivas comentadas anteriormente como los rotíferos o la *Artemia*.

Este estudio sugiere que el anfípodo *E. rapax* podría ser utilizado tanto para el control biológico del parásito *N. melleni* como para ser empleado como presa viva nutricionalmente adecuada en las primeras etapas del ciclo de vida de peces en acuicultura. En relación con el control biológico, los experimentos realizados se consideran preliminares, ya que se han ajustado continuamente para optimizarlos y mejorar nuestro entendimiento sobre la interacción entre ambas

especies. Sería interesante continuar esta línea de investigación, considerando realizar pruebas en tanques con *S. dumerili* infectada por el parásito monogeneo, como un siguiente abordaje.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el estudio permiten extraer las siguientes conclusiones:

- El anfípodo *Elasmopus rapax* puede capturar e ingerir huevos de *Neobenedenia melleni*.
- El fotoperiodo y la temperatura son factores que afectan la supervivencia del anfípodo *E. rapax*.
- El perfil de ácidos grasos LC-PUFA de *E. rapax* lo hace particularmente atractivo para el cultivo larval de especies marinas de interés acuícola, aunque es necesario asegurar una alimentación que preserve su composición natural bajo condiciones de cultivo.
- El anfípodo *E. rapax* se presenta como un organismo de interés con un doble propósito para su cultivo: el control biológico de parásitos monogéneos y su uso como presa viva alternativa particularmente rica en omega-3 LC-PUFA.

The results obtained in the study allow the following conclusions to be drawn:

- The amphipod *Elasmopus rapax* can capture and ingest *Neobenedenia melleni* eggs.
- Photoperiod and temperature are factors affecting the survival of the amphipod *E. rapax*.
- The LC-PUFA fatty acid profile of *E. rapax* makes it particularly attractive for larval culture of marine species of aquaculture interest, although it is necessary to ensure a feed that preserves its natural composition under culture conditions.
- The amphipod *E. rapax* is presented as an organism of interest with a dual purpose for its culture: the biological control of monogenean parasites and its use as an alternative live prey particularly rich in omega-3 LC-PUFA.

7. AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo de fin de máster.

En primer lugar, agradezco a mi tutor Manuel Alejandro Marrero Arteaga, por su dedicación y el apoyo constante a lo largo de todo el proceso. Sus horas de dedicación y su compromiso fueron muy importantes para el desarrollo y el planteamiento de este estudio.

También a mi tutora, Covadonga Rodríguez González, por su orientación, sus consejos en los momentos difíciles del proceso de redacción y su tiempo.

A José Antonio Pérez Pérez y al proyecto THINKINAZUL, por darme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación y por su continua atención e interés a lo largo de todo el proceso.

Asimismo, quiero agradecer a Salvador Jerez Herrera del IEO por compartir su línea de estudio, proporcionarnos los recursos necesarios como los anfípodos y los huevos, y estar siempre disponible para ayudarnos y compartir sus conocimientos.

Agradezco a D. Jesús Daniel Torrejón Rodríguez por su labor en la planta del IEO.

A Nieves Guadalupe Acosta González, por su ayuda en las tareas de laboratorio.

Finalmente, a mis padres, Montserrat y Marc, y a mi hermana, Milena, por los ánimos y el amor que me han transmitido, sus ganas de ayudar y su interés en leer este trabajo. Su apoyo y motivación fueron esenciales en este proceso.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aaen, S. M., Helgesen, K. O., Bakke, M. J., Kaur, K., y Horsberg, T. E. 2015. Drug resistance in sea lice: A threat to salmonid aquaculture. *Trends in Parasitology*, 31(2), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.006>.
- Bader, C., Starling, D. E., Jones, D. E., y Brewer, M. T. 2019. Use of praziquantel to control platyhelminth parasites of fish. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 42(2), 139–153. <https://doi.org/10.1111/jvp.12735>.
- Baeza-Rojano, E. 2012. Crustáceos anfípodos: una alternativa al alimento vivo usado tradicionalmente en acuicultura. *Chronica Naturae*, 2, 64–72.
- Becker, J. H., y Grutter, A. S. 2004. Cleaner shrimp do clean. *Coral Reefs*, 23(4), 515–520. <https://doi.org/10.1007/s00338-004-0429-3>.
- Becker, J. H., y Grutter, A. S. 2005. Client fish ectoparasite loads and cleaner shrimp *Urocaridella* sp. c hunger levels affect cleaning behaviour. *Animal Behaviour*, 70(5), 991–996. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.01.004>.
- Cejas, J. R., Jerez, S., Doble, A., Almansa, E., Martín, M. V, y Felipe, B. C. 2014. A simple method to monitoring the parasite population of *Benedenia seriolae* in rearing tanks of *Seriola dumerili*. IV Simposio Internacional de Ciencias del Mar 2014. Las Palmas de Gran Canaria (España) 343-344.
- Chapelle, S. 1977. Lipid composition of tissues of marine crustaceans. *Biochemical Systematics and Ecology*, 5(3), 241–248. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(77\)90010-2](https://doi.org/10.1016/0305-1978(77)90010-2).
- Christie, W. W. y Han, X. 2010. Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis: Fourth Edition. *Woodhead Publishing*. Cambridge (Inglaterra) . <https://doi.org/10.1533/9780857097866>.
- Conradi, M., Cervera, L., 1995. Variability in trophic dominance of amphipods associated with the bryozoan *Bugula neritina* (L., 1758) in Algeciras Bay (Southern Iberian Peninsula). *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 42(4).
- D'Armas, H., Yáñez, D., Reyes, D. y Salazar G. 2009. Composición de ácidos grasos de los caracoles marinos *Phyllonotus pomum* y *Chicoreum brevifrons* (Gastropoda: Muricidae). *Revista de Biología Tropical*, 58(2), 645-654. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442010000200009&lng=en&tlng=es.
- De March, B. G. E. 1977. The effects of photoperiod and temperature on the induction and termination of reproductive resting stage in the freshwater amphipod *Hyaella azteca* (Saussure) . *Canadian Journal of Zoology*, 55(10), 1595–1600. <https://doi.org/10.1139/z77-208>.
- Deveney, M. R., Chisholm, L. A., y Whittington, I. D. 2001. First published record of the pathogenic monogenean parasite *Neobenedenia melleni* (Capsalidae) from Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46(1), 79–82. <https://doi.org/10.3354/dao046079>.
- Dipper, F. 2022. Human impacts 1: sea fisheries and aquaculture. In *Elements of Marine Ecology*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102826-1.00006-5>.
- Erkinharju, T., Dalmo, R. A., Hansen, M., y Seternes, T. 2021. Cleaner fish in aquaculture: review on diseases and vaccination. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 189–237. <https://doi.org/10.1111/raq.12470>.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane-Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64849-5)

- Gentry, K., Bui, S., Oppedal, F., y Dempster, T. 2020. Sea lice prevention strategies affect cleaner fish delousing efficacy in commercial atlantic salmon sea cages. *Aquaculture Environment Interactions*, 12, 67–80. <https://doi.org/10.3354/AEI00348>.
- Giari, L., Fano, E. A., Castaldelli, G., Grabner, D., y Sures, B. 2020. The ecological importance of amphipod-parasite associations for aquatic ecosystems. *Water (Switzerland)*, 12(9), 1–22. <https://doi.org/10.3390/w12092429>.
- Guerra-García, J. M., Tierno de Figueroa, J. M., Navarro-Barranco, C., Ros, M., Sánchez-Moyano, J. E., y Moreira, J. 2014. Dietary analysis of the marine Amphipoda (Crustacea: Peracarida) from the Iberian Peninsula. *Journal of Sea Research*, 85, 508–517. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2013.08.006>.
- Hardwood, J. L. 2019. Algae: Critical sources of Very Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *Biomolecules*, 9(11), 708. <https://doi.org/10.3390/biom9110708>.
- Hernández, V. 2016. Ecología de los anfípodos asociados a macroalgas en litorales rocosos. *Seminario de grado de Doctorado del Postgrado en Ecología*. Universidad Central de Venezuela (Venezuela).
- Hoai, T. D., y Hutson, K. S., 2014. Reproductive strategies of the insidious fish ectoparasite, neobenedenia sp. (Capsalidae: Monogenea). *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108801>.
- Imsland, A. K., Reynolds, P., Eliassen, G., Hangstad, T. A., Nytrø, A. V., Foss, A., Vikingstad E., Elvegård, T. A. 2015. Feeding preferences of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) maintained in open net-pens with Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 436, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.048>.
- Jerez Herrera, S. J., Martín, V., Missol-Rollón, A., Santamaría-Rodríguez, F., y Lago-Rouco, M. J. 2022. Evolución de los ectoparásitos *Zeuxapta seriolae*, *Sparicotyle chrysophrii* y *Neobenedenia melleni* en el cultivo de *Seriola dumerili* y *Sparus aurata*. XVIII Congreso Nacional de Acuicultura 2022. Cádiz (España) 410-411.
- Jerez, S., Samper, M., Santamaría, F. J., Villamandos, J. E., Cejas, J. R., y Felipe, B. C. 2006. Natural spawning of greater amberjack (*Seriola dumerili*) kept in captivity in the Canary Islands. *Aquaculture*, 252(2-4), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.031>.
- Jiao, L., Dai, T., Lu, J., Tao, X., Jin, M., Sun, P., y Zhou, Q. 2022. Excess iron supplementation induced hepatopancreas lipolysis, destroyed intestinal function in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Marine Pollution Bulletin*, 176, 113421. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113421>.
- Jiménez, P. 2018. Uso de los anfípodos (Crustacea: Peracarida: Amphipoda) en acuicultura. *Tesis doctoral para optar al título de Doctor*. Universidad de Sevilla (España).
- Jiménez, P., Hachero-Cruzado, I., y Guerra-García, J. M. 2021. Aquaculture waste as food for amphipods: the case of *Gammarus insensibilis* in marsh ponds from southern Spain. *Aquaculture International*, 29(1), 139–153. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00615-z>.
- Kabeya, N., Fonseca, M. M., Ferrier, D. E. K., Navarro, J. C., Bay, L. K., Francis, D. S., Tocher, D. R., Castro, L. F. C., Monroig, Ó, 2018. Genes for de novo biosynthesis of omega-3 polyunsaturated fatty acids are widespread in animals. *Science Advances* 4, eaar6849.
- Kerber, C. E., Sanches, E. G., Santiago, M., y Luque, J. L. 2011. First record of *neobenedenia melleni* (Monogenea: Capsalidae) in sea-farmed cobia (*Rachycentron canadum*) in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 20(4), 331–333. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612011000400013>.
- Lolas, A., Karapanagiotidis, I. T., Neofitou, N., y Panagiotaki, P. 2018. Use of caprellid amphipods as alternative protein and lipid source in farmed fish nutrition. *The 3rd International Congress on Applied Ichthyology and Aquatic Environment*, 8-11.

- Militz, T. A., y Hutson, K. S. 2015. Beyond symbiosis: Cleaner shrimp clean up in culture. *PLoS ONE*, 10(2), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117723>.
- Monge-Ortiz, R., Tomás-Vidal, A., Rodríguez-Barreto, D., Martínez-Llorens, S., Pérez, Jover-Cerdá, M. y Lorenzo, A. 2018. Replacement of fish oil with vegetable oil blends in feeds for greater amberjack (*Seriola dumerili*) juveniles: Effect on growth performance, feed efficiency, tissue fatty acid composition and flesh nutritional value. *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 605-615. <https://doi.org/10.1111/ANU.12595>.
- Monroig, Ó., Tocher, D. R., y Navarro, J. C. 2013. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: Recent advances in molecular mechanisms. *Marine Drugs*, 11(10), 3998–4018. <https://doi.org/10.3390/md11103998>.
- Navarro, J. C., Ribes, A., Vilena, A., Bainour, K., Ramos, M., Hontoria, F., Monroig, Ó. 2021. Los invertebrados marinos como fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3. *XVIII Congreso Nacional de Acuicultura* 86–88. Cádiz (España).
- Östlund-Nilsson, S., Becker, J. H. A., y Nilsson, G. E. 2005. Shrimps remove ectoparasites from fishes in temperate waters. *Biology Letters*, 1(4), 454–456. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0363>.
- Overton, K., Barrett, L. T., Oppedal, F., Kristiansen, T. S., y Dempster, T. 2020. Sea lice removal by cleaner fish in salmon aquaculture: A review of the evidence base. *Aquaculture Environment Interactions*, 12, 31–44. <https://doi.org/10.3354/aei00345>.
- Özcan, F. 2010. Efecto de la Artemia enriquecida con distintas emulsiones comerciales sobre el crecimiento y desarrollo esquelético del lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). *Tesis para la obtención del Título de Máster Oficial en Cultivos Marinos*. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (España).
- Potts, G. W. 1973. Cleaning symbiosis among british fish with special reference to crenilabrus melops (labridae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 53(1), 1–10. <https://doi.org/10.1017/S0025315400056587>.
- Pousis, C., Rodríguez, C., De Ruvo, P., De Virgilio, C., Pérez, J. A., Mylonas, C. C., Zupa, R., Passantino, L., Santamaria, N., Valentini, L., y Corriero, A. 2019. Vitellogenin receptor and fatty acid profiles of individual lipid classes of oocytes from wild and captive-reared greater amberjack (*Seriola dumerili*) during the reproductive cycle. *Theriogenology*, 140, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.08.014>.
- Rodríguez-Barreto, D. 2014. Reconstrucción de pedigrí y valoración de los requerimientos en ácidos grasos en reproductores de *Seriola dumerili*. Tesis para la obtención del grado de Doctor en Ciencias. Universidad de La Laguna (España).
- Rodríguez-Barreto, D., Jerez, S., Cejas, J. R., Martín, M. V., Acosta, N. G., Bolaños, A., y Lorenzo, A. 2017. Effect of different rearing conditions on body lipid composition of greater amberjack broodstock (*Seriola dumerili*). *Aquaculture Research*, 48(2), 505-520. <https://doi.org/10.1111/ARE.12898>.
- Rodrigues Filho, J. D. A. 2010. Alterações morfológicas e hormonais das gônadas e da hipófise da garoupa *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae) durante a inversão sexual. Tesis para la obtención del Título de Maestro en Ciencias en el área de Fisiología. Universidade de São Palulo (Brazil).
- Sarih, S., Djellata, A., Fernández-Palacios, H., Ginés, R., Fontanillas, R., Rosenlund, G., Izquierdo, M., Roo, J. 2020. Adequate n-3 LC-PUFA levels in broodstock diets optimize reproductive performance in GnRH injected greater amberjack (*Seriola dumerili*) equaling to spontaneously spawning broodstock. *Aquaculture*, 520, 735007. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735007>.
- Semsar-Kazerouni, M., Boerriqter, J. G. J., y Verberk, W. C. E. P. 2020. Changes in heat stress tolerance in a freshwater amphipod following starvation: The role of oxygen availability, metabolic rate, heat shock proteins and energy reserves. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 245

110697. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110697>.

Steele, V. J. 1967. Resting stage in the reproductive cycles of *Gammarus*. *Nature* (London), 214: 103.

Trasviña-Moreno, A. G. 2018. Influencia de compuestos anti-parasitarios de origen natural en la respuesta inmune y control de la infección con *Neobenedenia* sp. en *Seriola lalandi*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (México).

Valles, I., Ascencio, F., Sicard, T., Angulo, C., Fajer, E. J., Inohuye, R. B., & Pérez, J. C. 2019. Effects of temperature on the life cycle of *Neobenedenia* sp. (Monogenea: Capsalidae) from *Seriola rivoliana* (Almaco jack) in Bahía de La Paz, BCS Mexico. *Parasitology Research*, 118(12), 3267–3277. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06460-1>.

Vaughan, D. B., Grutter, A. S., Costello, M. J., y Hutson, K. S. 2017. Cleaner fishes and shrimp diversity and a re-evaluation of cleaning symbioses. *Fish and Fisheries*, 18(4), 698–716. <https://doi.org/10.1111/faf.12198>.

Vereshchagina, K. P., Lubyaga, Y. A., Shatilina, Z., Bedulina, D., Gurkov, A., Axenov-Gribanov, Baduev, B., Kondrateva, E. S., Gubanov, M., Zadereev, E., Sokolova, I., Timofeyev, M. 2016. Salinity modulates thermotolerance, energy metabolism and stress response in amphipods *Gammarus lacustris*. *PeerJ*, 4, e2657. <https://doi.org/10.7717/peerj.2657>.

Villena, A., Jerez, S., Felipe, B. C., Misol, A., Rodríguez, C. y Pérez, J. A. 2019. Incidencia y control de *Neobenedenia melleni* en la seriola (*Seriola dumerili*) en instalaciones de cultivo en Tenerife. *XVII Congreso Nacional de Acuicultura 2019*. Cartagena (España) 166–167.

Zupa, R., Rodríguez, C., Mylonas, C. C., Rosenfeld, H., Fakriadis, I., Papadaki, M., Pérez, J. A., Pousis, C., Basilone, G., Corriero, A. 2017. Comparative Study of Reproductive Development in Wild and Captive-Reared Greater Amberjack *Seriola dumerili* (Risso, 1810). *PLOS ONE*, 12(1), e0169645. doi:10.1371/journal.pone.0169645.

8.1 WEBGRAFÍA

Acuicultura de España, 2020. *Seriola* de acuicultura: descubre al pez limón. <https://acuiculturadeespana.es/blog/seriola-tambien-es-conocida-como-pezu-limon/> (consultado el 20 de marzo de 2024).

Aphotomarine, 2024. *Elasmopus rapax*. https://www.aphotomarine.com/amphipod_elasmopus_rapax.html (consultado el 10 de junio de 2024).

Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR), 2023. <https://apromar.es/> (consultado el 10 de junio de 2024).

Cabildo de Tenerife, 2024. *Acuicultura*. [Chttps://www.tenerife.es/portalcabtfe/es/temas/pesca/acuicultura](https://www.tenerife.es/portalcabtfe/es/temas/pesca/acuicultura) (consultado el 10 de marzo de 2024).

Directorate of Fisheries, 2024. *Statistics: Cleanerfish (Lumpfish and Wrasse)*. <https://www.fiskeridir.no/English/Aquaculture/Statistics/Cleanerfish-Lumpfish-and-Wrasse> (consultado el 7 de junio de 2024).

DIVERSIFY, 2013 <http://www.diversifyfish.eu/> (consultado el 25 de junio de 2024).

Europa Azul, 2022. Arranca el proyecto Planaser para diversificar la acuicultura sostenible canaria. <https://europa-azul.es/planaser-seriola/> (consultado el 3 de marzo de 2024).

European Commission, 2021. Overview of EU aquaculture (fish farming): Aquaculture production. https://oceans-and-fisheries.ec.europa.eu/ocean/blue-economy/aquaculture/overview-eu-aquaculture-fish-farming_ (consultado el 10 de junio de 2024).

FishBase. <https://www.fishbase.se/search.php>. (consultado el 17 de febrero de 2024).

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2022. FAO Strategic Framework 2022-2031. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/45f12eb4-4625-4a59-af29-8305379fc710/content> (consultado el 23 de junio de 2024).

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2024. Código de Conducta para la Pesca Responsable. <https://www.fao.org/iuu-fishing/international-framework/code-of-conduct-for-responsible-fisheries/es/> (consultado el 10 de junio de 2024).

Meteostat, 2024. Tenerife/Los Rodeos. <https://meteostat.net/es/station/60015?t=2024-04-11/2024-04-12> (consultado el 28 de junio de 2024).

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2022. Producción acuicultura engorde 2022. https://www.mapa.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/produccion_engorde_2022_tcm30-626952.pdf (consultado el 10 de junio de 2024).

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2024. Fondo Europeo Marítimo, de Pesca y de Acuicultura (FEMPA). <https://www.mapa.gob.es/es/pesca/temas/fondos-europeos/fempa/> (consultado el 10 de junio de 2024).

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2024. Pez limón. https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/0059pez-limon_tcm30-102569.pdf (consultado el 17 de febrero de 2024).

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2009. Global agriculture towards 2050. https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/HLEF2050_Global_Agriculture.pdf (consultado el 10 de junio de 2024).

Pleamar, 2022. Proyecto AIRAM: Los crustáceos que son capaces de reciclar los desechos de la acuicultura. <https://www.programapleamar.es/actualidad/noticias/proyecto-airam-los-crustaceos-que-son-capaces-de-reciclar-los-desechos-de-la> (consultado el 30 de junio de 2024).

Reef Resilience Network, 2024. ¿Qué es la acuicultura? <https://reefresilience.org/es/management-strategies/aquaculture/aquaculture-introduction/> (consultado el 9 de junio de 2024).

Sea Life Base, 2024. *Elasmopus rapax*. <https://www.sealifebase.se/search.php> (consultado el 15 de mayo de 2024).

Turnbull, John, 2014. *Seriola dumerili*. Flickr <https://www.flickr.com/photos/>. [Licencia Creative Commons] (consultado el 5 de junio de 2024).

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 2023. Una tesis de la ULPGC demuestra el potencial del medregal para incorporarse a la acuicultura de la UE y expandirla. ULPGC. <https://www.ulpgc.es/noticia/tesis-ulpgc-demuestra-potencial-del-medregal-incorporarse-acuicultura-ue-y-expandirla> (consultado el 20 de febrero de 2024).