

Enriquecimiento en ácidos grasos omega-3 de
cadena larga (ω -3 LC-PUFA) en *Hediste
diversicolor*. Influencia de la temperatura y el
alimento

Enrichment of long chain omega-3 fatty acids
(ω -3 LC-PUFA) in *Hediste diversicolor*.
Influence of temperature and food

Lucía Ortiz Miralles
Máster Biología Marina: Biodiversidad y Conservación

Septiembre 2021

AUTORIZACIÓN DEL TUTOR/ES

El **Dr. José Antonio Pérez Pérez**, Profesor Ayudante Doctor de la Universidad de La Laguna y la **Dra. Inmaculada Rasines Pérez**, Científica Titular de OPIS del Instituto Español de Oceanografía-Centro Oceanográfico de Santander, como Tutor Académico y Tutora Externa, respectivamente,

DECLARAN:

Que la memoria presentada por la Graduada en Biología, **Dña. Lucía Ortíz Miralles** titulada "**Enriquecimiento de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga (omega-3 LC-PUFA) en *Hediste diversicolor*. Influencia de la temperatura y el alimento**", 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 2020-2021.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente informe favorable en San Cristóbal de La Laguna a 01 de septiembre de 2021.



Fdo. Dr. José Antonio Pérez Pérez

Fdo. Dra. Inmaculada Rasines Pérez

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: 3763722 Código de verificación: /u70ANs6

Firmado por José Antonio Pérez Pérez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/09/2021 13:27:16

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Los invertebrados marinos en la acuicultura.....	1
1.2. <i>Hediste diversicolor</i> . Importancia ecológica, comercial, papel como organismo modelo en investigación y potenciales funciones en acuicultura.....	1
1.3. Situación actual de la producción acuícola mundial y la búsqueda de materias primas alternativas.....	4
1.4. Clasificación y estructura de los ácidos grasos.....	6
1.5. Papel biológico de los ácidos grasos y la importancia de los LC-PUFA.....	7
2. Objetivos.....	9
3. Material y Métodos.....	10
3.1. Diseño experimental.....	10
3.1.1. Experimento: Cultivo de ejemplares bajo dos temperaturas.....	10
3.1.2. Experimento: Cultivo de ejemplares con diferentes dietas.....	14
3.2. Análisis lipídico.....	17
3.2.1. Extracción y purificación de lípidos.....	17
3.2.2. Transmetilación de lípidos y obtención de los ésteres metílicos de ácidos grasos.....	18
3.2.3. Cromatografía de gases.....	19
3.2.4. Determinación de clases lipídicas.....	20
3.3. Análisis estadístico.....	22
4. Resultados.....	24
4.1. Experimento: Cultivo de ejemplares bajo dos temperaturas.....	24
4.1.1. Crecimiento de poliquetos.....	24
4.1.2. Composición lipídica de poliquetos.....	24
4.2. Experimento: Cultivo de ejemplares con diferentes dietas.....	28
4.2.1. Composición lipídica del alimento.....	28
4.2.2. Crecimiento de poliquetos.....	31
4.2.3. Composición lipídica de poliquetos.....	32
5. Discusión.....	36
6. Conclusiones.....	39
7. Bibliografía.....	40

Resumen

Hediste diversicolor es una especie con alto potencial en la acuicultura ya que es fácilmente cultivable, adecuada para diseños de acuicultura multitrofica integrada, y posee un alto contenido en n-3 LC-PUFA. La creciente demanda de harinas y aceite de pescado en la acuicultura hace necesario desarrollar ingredientes alternativos sostenibles que reemplacen con éxito estos compuestos. Con el fin de encontrar alimentos sostenibles para la acuicultura y explorar condiciones que mejoren el crecimiento de *H. diversicolor* y potencien su contenido de n-3 LC-PUFA, se realizaron dos diseños experimentales. Se cultivaron ejemplares de *H. diversicolor* a dos temperaturas distintas y, con las mismas condiciones ambientales, un ensayo de alimentación consistente en mantenerlos en inanición, y alimentados con pienso acuícola comercial y 4 diferentes cantidades de bagazo de cerveza. La SGR aumentó a temperaturas más elevadas y al incrementar la cantidad de bagazo en la dieta. No se encontraron diferencias en la SGR entre los organismos alimentados con pienso comercial y la dosis máxima de bagazo de cerveza. Los análisis lipídicos mostraron un aumento de n-3 LC-PUFA en los ejemplares cultivados en agua fría y con pienso. Estos resultados indican que para obtener *H. diversicolor* con un perfil lipídico rico en n-3 LC-PUFA, el empleo de agua fría es más favorable que el de cálida. Por otro lado, el uso bagazo como dieta no dio lugar a un perfil lipídico tan rico en n-3 LC-PUFA como la dieta de pienso, aunque los resultados de crecimiento sí fueron similares con ambos alimentos. El bagazo podría ser considerado como alimento para el cultivo de *H. diversicolor* como cebo de pesca.

Palabras clave: *Hediste diversicolor*, LC-PUFA, acuicultura, temperatura, bagazo de cerveza.

Abstract

Hediste diversicolor species has great potential in aquaculture due to being easily cultivable, fit for integrated multitrophic aquaculture designs in addition to having high n-3 LC-PUFA content. The increasing demand for fish meal and fish oil in aquaculture makes the development of alternative sustainable ingredients to successfully replace these compounds necessary. With the aim of finding food which is sustainable for aquaculture as well as exploring conditions which improve the *H. diversicolor* growth and boost its n-3 LC-PUFA content, two experiments were carried out. *H. diversicolor* specimens were cultivated at two different temperatures and, under the same environmental conditions, kept in starvation or fed with a commercial feed and 4 different amounts of brewery waste. SGR increased at higher temperatures and higher brewery waste diet intake. No differences in SGR were found between organisms fed with commercial feed and the maximum dose of brewery waste. The fatty acids profiles analyses showed an increase in n-3 LC-PUFA in the specimens which were cultivated with feed in cold water. These results denote that it is more profitable to use cold rather than warm water in order to cultivate *H. diversicolor* with an n-3 LC-PUFA rich lipid profile. Additionally, the brewery waste diet did not result in a lipid profile as rich in n-3 LC-PUFA as the feed diet. Nevertheless, the results concerning growth were similar with both diets. Brewery waste could be considered as food for *H. diversicolor* cultivation as fishing bait.

Keywords: *Hediste diversicolor*, LC-PUFA, aquaculture, temperature, brewery waste.

1. Introducción

1.1. Los invertebrados marinos en la acuicultura

Uno de los grupos de especies con mayor potencial son los invertebrados marinos. En los últimos años, se han estado cultivando invertebrados marinos para múltiples aplicaciones como: consumo, biorremediación, o extracción de sustancias bioactivas para usos farmacológicos y cosméticos. Como ejemplos de lo expuesto cabe citar la ortiguilla de mar (*Anemonia sulcata*), la cual está siendo cultivada en cautividad con fines comerciales para consumo humano (OESA, 2021). También es el caso del pepino de mar, en el que se ha comprobado que su cultivo, junto a otras especies de acuicultura, ayuda a controlar la proliferación bacteriana y prevenir la formación de biopelículas, minimizando el riesgo de brotes de bacterias patógenas, y mejorando así, la higiene de los tanques de cultivo en acuicultura (Sadeghi-Nassaj et al., 2018).

Los poliquetos son utilizados ampliamente en investigación, como modelo animal de laboratorio, por ejemplo, en estudios de reproducción, ecotoxicología, biorremediación y seguimiento ambiental (García-Alonso et al., 2008). En los últimos años, el comercio de cebo vivo se ha expandido, no solo por su importancia como cebo para pesca, sino también por su potencial como suministro de alimento en las dietas de especies de acuicultura (Pombo et al., 2020). Muchos gusanos anélidos marinos son especies de presas clave para los organismos acuáticos, incluidos peces económicamente importantes como el lenguado. Algunos estudios sugieren que los poliquetos podrían aportar un equilibrio nutricional de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, *del inglés Polyunsaturated Fatty Acids*) a crustáceos y peces planos, principalmente de la familia *Soleidae* (Cardinaletti et al., 2009). Su consumo por parte de especies como el lenguado, gambas y cangrejos promueve el desove y la maduración de las gónadas en los reproductores (Luis y Ponte, 1993; Luís y Passos, 1995).

1.2. *Hediste diversicolor*. Importancia ecológica, comercial, papel como organismo modelo en investigación y potenciales funciones en acuicultura.

Los poliquetos son el grupo taxonómico principal de los estuarios y juegan un rol muy importante en la bioturbación, transfiriendo materiales orgánicos y nutrientes de la columna de agua al sedimento y viceversa. El poliqueto *Hediste diversicolor* (O.F. Müller, 1776) (Figura 1) es una especie excavadora que habita los fondos blandos de ambientes marinos poco

profundos y aguas salobres, generalmente en sedimentos con alto contenido orgánico (Kristensen, 1983), en la zona templada norte de las costas atlánticas de Europa y América del Norte (Smith, 1977). Su abundancia en el ambiente extremo del intermareal requiere que *H. diversicolor* tolere temperaturas desde bajo cero en invierno, hasta valores altos en verano, rangos de salinidad desde cero hasta condiciones hipersalinas, así como déficit de oxígeno y hasta presencia de sulfuro. Este alto nivel de adaptabilidad permite su fácil cultivo y hace que sea un animal modelo para la experimentación (Smith, 1977). Las características del ciclo de vida (longevidad, época de desove, tácticas de alimentación y crecimiento) y la dinámica de la población (proporción de sexos, densidad y biomasa) varían mucho según la ubicación geográfica de las poblaciones. Además, se han encontrado diferencias morfológicas, bioquímicas y fisiológicas interpoblacionales en individuos de diferentes áreas y diferentes condiciones ambientales en las mismas áreas, las cuales podrían estar relacionadas con la limitada capacidad de dispersión de la especie.



Figura 1. Ejemplares de *Hediste diversicolor*.

La creciente importancia comercial de esta especie como cebo de pesca y fuente de alimento en la acuicultura y, en consecuencia, su recolección masiva, están causando perturbaciones a la comunidad bentónica y al ecosistema (Fidalgo y Costa et al., 2000). Es por eso que, es importante estudiar y estimular la producción de *H. diversicolor* en la acuicultura, para así evitar el agotamiento de este recurso natural y también para minimizar los impactos negativos que su disminución puede ocasionar en el medio ambiente (Nesto et al., 2012). En

este contexto, el desarrollo y optimización de nuevas técnicas de crianza de *H. diversicolor* a escala industrial es crucial y uno de los pasos clave para la exitosa cría de esta especie.

Por otro lado, *H. diversicolor* es una especie candidata para formar parte de los sistemas de acuicultura integrada (IMTA, del inglés *Integrated Multitrophic Aquaculture*), ya que puede reciclar eficientemente las partículas de nutrientes orgánicos presentes en los efluentes de las piscifactorías (Bischoff et al., 2009). Estos sistemas, promueven una producción más limpia, ya que los nutrientes desperdiciados en la acuicultura pueden transformarse en biomasa de poliquetos que puede a su vez ser empleada de nuevo, como cebo o como alimento en acuicultura. Este concepto de diseño ecológico maximiza y diversifica la producción acuícola, además de aumentar la eficiencia en el uso de nutrientes, agua y energía (Jerónimo et al., 2021).

Hediste diversicolor es omnívoro, su dieta es muy variada, alimentándose desde bacterias hasta detritos. Suele ser presa de peces y aves. Es capaz de cambiar su comportamiento de alimentación de acuerdo con las condiciones ambientales (Scaps, 2002). El canibalismo es bastante común en esta especie lo que podría ser una fuente de nutrientes esenciales (Batista et al., 2003) Debido a su abundancia, digestibilidad y alto contenido energético, desempeña un papel fundamental como especie clave en la red trófica de estuarios. Además, es un depredador de otros organismos bentónicos y un carroñero (Heip y Herman, 1979). Cuando *H. diversicolor* es consumido por depredadores, puede transferir cualquier compuesto, incluidos los ácidos grasos (AG), de sus tejidos a los organismos que se encuentran más arriba en la cadena alimentaria, pasando así dichos compuestos a todo el ecosistema (McLusky, 1989). Esta especie es conocida por su alto contenido en AG fisiológicamente importantes como los PUFA (Harrison, 1991; Santos et al., 2016), su valor nutricional es elevado y por tanto, son cada vez más frecuentemente utilizados como alimento en acuicultura (Olive, 1999). Además, estudios recientes, han demostrado la capacidad de *H. diversicolor* de sintetizar algunos AG *de novo* (Jerónimo et al., 2021). También parece ser que los diferentes tipos de dietas no varían demasiado la cantidad de n-3PUFA (García-Alonso et al., 2008). Hasta el momento, se ha determinado una gran variabilidad de AG en los tejidos de *H. diversicolor*, con valores que oscilan entre 50 µg y 280 µg de lípido por mg de tejido en peso seco (DW), todos ellos alimentados con piensos acuícolas comerciales (Fidalgo y Costa et al., 2000; García-Alonso et al., 2008; Jerónimo et al., 2021; Santos et al., 2016). Esta variabilidad, es consecuencia de varios factores, como la duración de los ensayos experimentales, la etapa de maduración de los poliquetos al inicio y durante los experimentos, la composición de la dieta suministrada, y las

condiciones abióticas experimentales durante el cultivo como por ejemplo la salinidad, fotoperiodo o temperatura (Jerónimo et al., 2021).

1.3. Situación actual de la producción acuícola mundial y la búsqueda de materias primas alternativas.

En 2018, la producción acuícola mundial alcanzó su récord histórico produciendo 114,5 millones de toneladas de peso vivo (FAO, 2020), siendo la mayor parte de las especies cultivadas alimentadas con piensos comerciales (FAO, 2020). La mayoría de teleósteos marinos (y otras especies de vertebrados, incluidos los humanos), presentan una capacidad limitada para biosintetizar *de novo* los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA, *del inglés Long-chain Polyunsaturated Fatty Acids*). Esta imposibilidad es debida, tanto a la falta de las enzimas desaturadas $\Delta 12$ y $\Delta 15$ responsables de producir PUFA a partir de ácido oleico (18:1n-9) (Monroig y Kabeya, 2018), como a la ausencia o reducida actividad de desaturadas $\Delta 6$ y $\Delta 5$ para producirlos a partir de sus precursores de 18 átomos de carbono como el ácido linolénico (18:3n-3) y el ácido linoleico (18:2n-6). Por tanto, es primordial que los alimentos acuícolas posean un perfil equilibrado de LC-PUFA, y no de sus AG precursores, para obtener rendimientos adecuados y favorecer el bienestar animal.

Las harinas y aceites de pescado, suelen formar parte del alimento comercial acuícola aportando un perfil equilibrado de LC-PUFA. Sin embargo, estos dos recursos son cada vez más escasos y costosos (FAO, 2020), resultando en que la actividad sea, actualmente, insostenible medioambientalmente. Tradicionalmente, las dietas en acuicultura, sobre todo de peces carnívoros, han estado compuestas principalmente por harinas y aceites de pescado, siendo este sector el responsable del consumo de aproximadamente el 90% del aceite de pescado que se produce en el mundo (Turchini et al., 2010). De esta forma la acuicultura produce un impacto medioambiental muy elevado, ya que estos compuestos provienen de las pesquerías de pequeños pelágicos, lo que implica un índice FIFO (*del inglés, fish in fish out*) muy elevado, que podría dar lugar a una gran pérdida de diversidad marina (Tacon y Metian, 2008). Es por ello que, la utilización en acuicultura de piensos comerciales contribuye a la sobreexplotación de las pesquerías pelágicas, afectando a la sostenibilidad de la actividad (Tacon y Metian, 2008). De esta forma, la nutrición de peces carnívoros cultivados se considera responsable del mayor impacto ambiental que ejerce la acuicultura (Hixson, 2014).

Los alimentos acuícolas deben satisfacer las necesidades nutricionales de las especies cultivadas y salvaguardar que posean un perfil bioquímico óptimo para la nutrición humana, al

mismo tiempo que su producción sea sostenible con el medio ambiente. Esta situación hace necesario desarrollar ingredientes alternativos sostenibles y económicos para reemplazar con éxito estos ingredientes de origen marino con fuentes no tradicionales.

Estudios recientes indican que la sustitución de la harina de pescado por otros ingredientes alternativos como la soja o la colza, tiene un enorme potencial para reducir el impacto ambiental de la actividad por tonelada de alimento acuícola producido (Samuel-Fitwi et al., 2013). Por otro lado, el sector cervecero ocupa una destacada posición económica en el mercado financiero, produciendo 405 hectolitros anuales de cerveza dentro de la Unión Europea. Esto conlleva una alta producción de residuos, que se traducen cada año, en más de 7 millones de toneladas de grano de cebada utilizado, también conocido como bagazo (San Martín et al., 2020). En este contexto, los subproductos de la cerveza surgen como ingredientes potencialmente alternativos a la harina de pescado en los alimentos acuícolas debido a su disponibilidad y contenido nutricional. Sin embargo, reducir la dependencia de la acuicultura de los recursos marinos depende no solo del desarrollo de ingredientes alternativos, sino también de mejorar su eficiencia nutricional. Recientemente, se han llevado a cabo estudios en los que estos residuos son suministrados a algunas especies de teleósteos de gran interés para la acuicultura, como el lenguado (*Solea senegalensis*), la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y la dorada (*Sparus aurata*) (San Martín et al., 2020). La trucha y la dorada, fueron alimentadas con una sustitución parcial de la harina de pescado del pienso comercial por levadura y bagazo. La sustitución fue de un 20% para la levadura y de un 30% para el bagazo y el resultado fue una buena digestibilidad de proteínas, lípidos y aminoácidos. Concretamente, de entre 75 y 88% de digestibilidad para la trucha y de entre 71 y 88% para la dorada (Nazarro et al., 2021). También recientemente, Estévez et al. (2021) han llevado a cabo un estudio de alimentación de dorada con pienso comercial que incluía un 30% de levadura de cerveza y un 15% de bagazo, obteniéndose resultados de crecimiento y composición proteica final del filete de pescado muy similares al de ejemplares alimentados únicamente con pienso comercial.

Teniendo en cuenta que estos subproductos se producen en grandes cantidades en Europa, pueden ser una fuente potencial de proteínas para reducir el uso de proteínas vegetales o subproductos de pescado / animales (recortes) y aumentar la sostenibilidad de ambos sectores, la industria cervecera y la acuicultura (Estévez et al., 2021).

1.4. Clasificación y estructura de los ácidos grasos

Los AG están formados por cadenas hidrocarbonadas en cuyo extremo hay un grupo carboxilo. En mamíferos, tienen estructuras relativamente sencillas, pero en otros organismos se encuentran estructuras más complejas con ramificaciones o en forma de anillo.

El modo oficial de denominar los AG consiste en el número de átomos de carbono seguido por dos puntos y el número de dobles enlaces. La localización de estos enlaces dobles se indica por el número del átomo de carbono donde empieza, contando por el extremo metilo. Así, el ácido linoleico se designa 18:2n-6 porque contiene 18 átomos de carbono y posee 2 dobles enlaces que comienzan en el carbono número 6 contando desde el extremo metilo (Devlin, 2004).

Aquellos AG que presentan dos o más dobles enlaces se denominan poliinsaturados (PUFA), y aquellos PUFA que presentan 20 o más átomos de carbono y 3 o más dobles enlaces son los LC-PUFA o ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Dos son los grupos de PUFA más importantes, aquellos que presentan el primer doble enlace en el tercer átomo de carbono contando desde el metilo terminal, denominados omega-3 (w-3), y aquellos en los que el doble enlace se encuentra en el sexto átomo desde el metilo terminal, que se denominan omega-6 (w-6) (Figura 2) (Bell y Tocher, 2009).

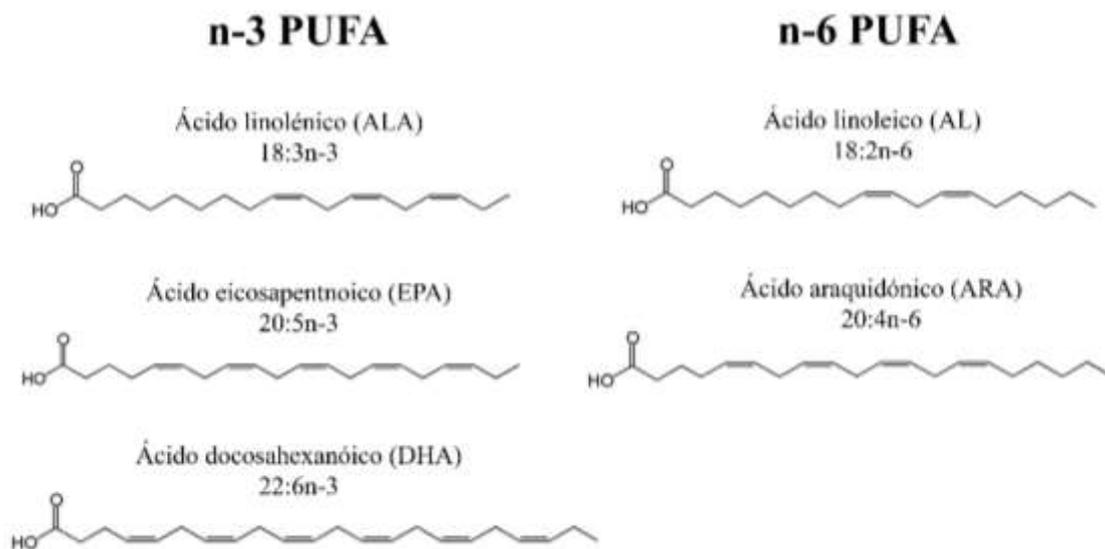


Figura 2. Descripción esquemática de las estructuras químicas de n-3 y n-6 PUFA (modificado de Hoppenbrouwers et al., 2019).

1.5. Papel biológico de los ácidos grasos y la importancia de los LC-PUFA

Los AG cumplen funciones energéticas, estructurales y reguladoras. Son moléculas altamente energéticas y necesarias en todos los procesos celulares en presencia de oxígeno. Cuando no hay carbohidratos disponibles para utilizar en los procesos celulares, el organismo quema AG con el fin de obtener energía. Los fosfolípidos y esfingolípidos cumplen una función estructural al formar parte de la bicapa lipídica de todas las membranas celulares. Muchos AG son precursores de tromboxanos, prostaglandinas, y leucotrienos, moléculas con una alta actividad biológica como la regulación de la temperatura corporal, procesos de coagulación sanguínea, contracción del músculo liso, respuesta inflamatoria, etc. (Devlin, 2004).

Los n-3 LC-PUFA son un grupo de ácidos grasos de gran importancia y transcendencia para la nutrición, bienestar y salud de vertebrados, incluyendo humanos al estar involucrados en la regulación de multitud de funciones fisiológicas.

Todos vertebrados, incluidos los humanos, necesitan un aporte externo en su dieta de algunos ácidos grasos insaturados, ya que no pueden ser sintetizados en la suficiente cantidad para el correcto funcionamiento del organismo. Esos ácidos grasos son los denominados esenciales (AGE) e incluyen a miembros de la serie w-3 y w-6. Los PUFA son aquellos son componentes esenciales que no pueden ser sintetizados por los vertebrados, dentro de ellos son los LC-PUFA los que cumplen funciones fisiológicas más importantes y poseen mayor actividad. Ellos son: el ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexanoico (DHA), pertenecientes a la serie w-3 y el ácido araquidónico (ARA) perteneciente a la serie w-6. Durante la síntesis de los LC-PUFA se generan algunos AG como productos intermedios, entre ellos el ácido dihomo- γ -linolénico (DHGLA; 20: 3n-6) y el ácido gamma-linolénico (GLA; 18: 3n-6), generados en la producción de n-6 y el ácido estearidónico (SDA; 18: 4n-3) y ácido eicosatetraenoico (ETA; 20: 4n-3), generados en la producción de n-3 (Sargent et al., 1995; Abedi y Sahari, 2014).

Las funciones de los LC-PUFA son muy importantes y variadas, destacando su función estructural formando parte de las membranas biológicas. En los mamíferos terrestres, el EPA, DHA y ARA son componentes básicos de los fosfolípidos que componen las membranas. Sin embargo, en los teleosteos, los componentes mayoritarios son el EPA y el ARA (Tocher, 2003). Esto es debido a que estos dos ácidos grasos son capaces de modificar la longitud de cadena y el número de insaturaciones. Esto les confiere la capacidad de modificar la fluidez de

membrana, entre otras capacidades fisiológicas, para así poder adaptarse a cambios de salinidad, temperatura y presión a los que se enfrentan en el gran océano (Rodríguez et al., 2012). Por otro lado, actúan como precursores de eicosanoides, compuestos de 20 átomos de carbono que cumplen una gran variedad de funciones fisiológicas como la producción de compuestos proinflamatorios y proargantes, especialmente los derivados del ARA, y compuestos antiinflamatorios, derivados del EPA (Lee et al., 2016). Ambos ácidos grasos compiten por las mismas enzimas en la síntesis de eicosanoides, por lo que su acción estará determinada por la relación ARA/EPA en las células que a su vez está condicionado por la ingesta de LC-PUFA (Tocher, 2003). Otro hecho que requiere una gran atención es la proporción y tipo de ácidos grasos que incluimos en nuestra dieta. Además, los PUFA pueden afectar a la regulación genética por diversos mecanismos, entre ellos: cambios en la composición de membrana, estrés oxidativo, modificación de factores de transcripción, producción de eicosanoides y activación de receptores nucleares (PPARs) (Tocher, 2015). Por otro lado, la ingesta de DHA se ha relacionado con un correcto funcionamiento del cerebro, condiciones cardiovasculares óptimas y agudeza visual. Esto es debido a que cumple funciones estructurales esenciales en los tejidos de la retina, cerebro y corazón (Ward y Singh, 2005). Además, la ingesta de DHA en la dieta aumenta la tolerancia al estrés en larvas de teleósteos (Kanazawa, 1997).

2. Objetivos

Con el fin de arrojar algo de luz sobre las cuestiones anteriormente mencionadas, el presente estudio tuvo como objetivos principales:

- 1) Evaluar el crecimiento y perfil lipídico (contenido lipídico, perfil de clases lipídicas y de ácidos grasos) del poliqueto *Hediste diversicolor* alimentado con pienso comercial durante 35 días bajo dos regímenes de temperatura diferentes
- 2) Evaluar el crecimiento y el perfil de lipídico (contenido lipídico, perfil de clases lipídicas y de ácidos grasos) de *Hediste diversicolor* cultivados en las mismas condiciones abióticas pero alimentados con pienso comercial, con diferentes cantidades de bagazo de cerveza y en inanición durante 30 días.

3. Material y Métodos

Fueron realizados dos experimentos en la planta experimental de cultivos marinos del Instituto Español de Oceanografía de Santander durante los meses de abril, mayo y junio de 2021. Por un lado, se realizó un cultivo de ejemplares de *Hediste diversicolor* alimentados con un pienso comercial (Europa 22, Skretting, Burgos, España) bajo dos regímenes de temperaturas distintas: fría ($11,3^{\circ}\text{C} \pm 0,75$) y cálida ($20,22^{\circ}\text{C} \pm 0,68$). Por otro lado, se realizó un cultivo de *H. diversicolor* bajo las mismas condiciones abióticas, pero con distintas dietas, las cuales consistieron en el pienso comercial anteriormente citado, bagazo de cerveza en distintas proporciones y en ausencia de alimento. En ambos experimentos, se realizó la misma batería de análisis lipídicos.

3.1. Diseño experimental

3.1.1. Experimento: Cultivo de ejemplares bajo dos temperaturas

Condiciones experimentales

El estudio se realizó en cilindros de PVC de 11 cm de diámetro y 20 cm de altura, cuyas paredes fueron sustituidas por una malla de 330 μm de luz (Figura 3). Estos cilindros estaban rellenos con una capa de sedimento (arena de cantera, grano entre 0,25-1,0 mm) de 12 cm de altura, bajo una capa de agua de 15 cm de profundidad. A su vez, los cilindros estaban ubicados en cubetas de polipropileno (superficie 0,189 m^2 , altura 0,30 m) en los que el agua entraba por la parte superior de la cubeta y desaguaba por la inferior. Estas cubetas se hallaban incluidas en sistemas de recirculación de agua (RAS, *del inglés Recirculation Aquaculture System*). Los RAS estaban equipados con un filtro mecánico, un filtro biológico, un skimmer, un sistema de esterilización por luz ultravioleta y calentadores eléctricos con termostato o refrigerador para la regulación de la temperatura.



Figura 3. Cilindro de PVC para el cultivo de *Hediste diversicolor*.

En cada sistema RAS se aplicaron dos tratamientos: agua caliente con una temperatura entre 19 y 21°C, y agua fría, con una temperatura que osciló entre 10,4 y 12,8°C. Cada tratamiento constó de 5 réplicas/cilindros. El cultivo fue desarrollado en condiciones de fotoperiodo de 16 horas de luz (08:00-24:00) y 8 horas de oscuridad (24:00-08:00). Se registró diariamente la temperatura, salinidad, oxígeno y pH, y semanalmente, los niveles de NH_4^+ , PO_4 y NO_2 , así como el caudal en cada cubeta que era ajustado a 1,5 L/minuto. Para medir la temperatura se empleó un termómetro digital Checktemp® Hanna, para el oxígeno disuelto un oxímetro OxyGuard® Handy Polaris y la salinidad fue medida con un refractómetro digital Milwaukee® MA887. Los niveles de NH_4^+ fueron determinados con un test colorimétrico Aquaquant® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y los de PO_4 y NO_2 con un test de sera GmbH® (Immenhausen, Alemania). Los datos obtenidos en estas mediciones se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros físico-químicos durante el cultivo de *Hediste diversicolor* bajo dos temperaturas.

Parámetros físico-químicos	Agua fría	Agua cálida
Temperatura (°C)	11,33 ± 0,76	20,24 ± 0,68
Salinidad (g/L)	36,14 ± 0,81	35,83 ± 1,07
pH	7,92 ± 0,10	8,02 ± 0,17
Oxígeno (%)	98,57 ± 2,30	95,60 ± 3,64
NH_4^+ (mg/L)	0,014 ± 0,067	0
NO_2 (mg/L)	0	0
PO_4 (mg/L)	0	0,01 ± 0,042

Ejemplares experimentales

Los ejemplares procedían del stock permanente de *H. diversicolor* existente en la Planta de Cultivos del IEO de Santander. Este stock se mantiene en tanques de 1 m², con una capa de arena de aproximadamente 20 cm, con aireación y circuito abierto de agua con la temperatura natural de la zona, y están alimentados con pienso comercial SKRETTING®. Se seleccionaron individuos de entre 50 y 70 mg de peso húmedo. La extracción de estos individuos se llevó a cabo mediante el sifonado y cribado de un cuarto de la superficie total del tanque de stock, a través de un tamiz de 1000 µm de luz de malla. Una vez eliminada la mayor parte de la arena, y dado que *H. diversicolor* es una especie formadora de galerías, es frecuente encontrarla formando agregados con el sedimento. Para obtener los ejemplares limpios, todo el material tamizado fue procesado en una mesa de lavado con agua de mar sobre la que se encontraba una rejilla de PVC con 1 cm de luz, y sobre esta, una red de plástico de 0,5 cm de luz (Figura 4). Los agregados de restos de tubería, arena y poliquetos, se dejaron reposar en seco sobre la malla de 0,5 cm durante 30 minutos, permitiendo así que el poliqueto se desplazara por sí mismo a la zona de agua limpia. Pasado este tiempo, se retiró la malla y con unas pinzas se recogieron los individuos del tamaño aproximado al requerido para el experimento, que se depositaron en un recipiente con agua de mar. Para seleccionar la fracción de individuos de interés en el presente estudio, los ejemplares recolectados fueron depositados brevemente en tandas de 10 en 10 sobre papel de filtro, para retirar el exceso de agua y a continuación fueron pesados en una microbalanza Mettler toledo® PB303-S. Los ejemplares de entre 50-70 mg fueron seleccionados y repartidos en 10 lotes de 10 individuos cada uno, que fueron sembraron en los cilindros (densidad de siembra 1000 ind/m²). La biomasa inicial media por cilindro fue de 585,3 ± 28,5 mg.



Figura 4. Agregados de *Hediste diversicolor* sobre red durante su recolección.

Alimentación y crecimiento

Los poliquetos fueron alimentados con pienso comercial de lenguado de SKRETTING® (0,35-0,50 mm). Se estableció un régimen de alimentación diario de pienso de un 4% de la biomasa de poliquetos de cada cilindro, aumentando esta cantidad diariamente en base a la tasa de crecimiento específica (SGR, *del inglés Specific Growth Rate*) estimada para esta especie, que es de $6\% \text{ d}^{-1}$ para el tratamiento agua cálida, y $5\% \text{ d}^{-1}$ para el tratamiento agua fría (Fidalgo y Costa et al., 2000; Santos et al., 2016). Tras 14 de experimentación, se realizó un muestreo de peso húmedo de todos los individuos de cada uno de los cilindros, para así realizar una nueva estimación de la biomasa, y ajustar la alimentación comprobando que la SGR permanecía en $5\% \text{ d}^{-1}$ en el tratamiento de agua fría mientras que aumentó a $7\% \text{ d}^{-1}$ en el tratamiento de agua cálida. Al termino del experimento el día 35, se llevó a cabo el muestreo final de peso húmedo de los ejemplares. Se halló la SGR del primer periodo de crecimiento (SGR1, día 0 a día 14 de cultivo); la SGR del segundo periodo (SGR2, día 14 a día 35), y la SGR global de todo el experimento (SGRT), es decir, desde el inicio, hasta los 35 días de cultivo. También se calculó la tasa de crecimiento diaria (DGR, *del inglés Daily Growth Rate*). Para el cálculo de las diferentes tasas de crecimiento se emplearon las siguientes fórmulas:

$$SGR (\%d^{-1}) = \frac{\ln \text{Peso húmedo final} - \ln \text{Peso húmedo inicial}}{\text{días}} \times 100$$

$$DGR (gd^{-1}) = \frac{\text{Peso húmedo final} - \text{Peso húmedo inicial}}{\text{días}}$$

El día del muestreo final se llevó también a cabo un recuento del número de ejemplares para valorar la tasa de supervivencia. Una vez muestreados, se dejaron los individuos durante 24 horas en ayunas en recipientes con agua limpia y sin sedimento, ya que en este puede haber partículas de alimento, para que eliminaran restos de la dieta ingerida que pudieran interferir con los resultados de los análisis bioquímicos. Transcurrido este periodo, se procedió a su aclarado con agua dulce y posterior ultracongelación a -80°C. El transporte hasta las instalaciones de la Universidad de La Laguna donde se desarrollaron las determinaciones analíticas, se realizó en una caja de poliestireno con hielo seco quedando así conservados para el subsecuente análisis.

3.1.2. Experimento: Cultivo de ejemplares con diferentes dietas

Condiciones experimentales

El estudio se realizó en los mismos cilindros de PVC descritos en el experimento anterior, con el mismo volumen de arena y dentro de las tres cubetas descritas anteriormente, las cuales se encontraban incluidas en un sistema de circulación de agua abierto con temperatura natural de entre 12,3 y 15,3°C.

Se agruparon los poliquetos en 6 grupos experimentales que recibieron un tipo de dieta diferente cada uno de ellos:

1. Tratamiento “Inanición” al que no se le suministró alimento;
2. Tratamiento “Pienso”, al que se le suministró pienso comercial SKRETTING®;
3. Tratamiento “BC”, al que se le suministró bagazo de cerveza;
4. Tratamiento “BC1/2”, al que se le suministró la mitad de bagazo que en el tratamiento “BC”;
5. Tratamiento “BC2”, al que se le suministró el doble de bagazo que en el tratamiento “BC”;
6. Tratamiento “BC4”, al que se le suministró 4 veces más bagazo que en el tratamiento “BC”.

Cada tratamiento constaba de 3 réplicas/cilindros y cada una de las réplicas se encontraba en una cubeta, disponiéndose en su interior los cilindros de los distintos tratamientos de forma aleatoria. A excepción de la temperatura, el resto de condiciones experimentales fueron iguales a las descritas en el experimento anterior, así como los procedimientos y kits empleados para la medición y control de los parámetros físico-químicos. Los datos obtenidos de la medición de parámetros físico-químicos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros físico-químicos durante el cultivo de *Hediste diversicolor* con diferentes dietas.

Parámetros físico-químicos	
Temperatura (C°)	14,05 ± 0,96
Salinidad (g/L)	35,65 ± 0,57
pH	7,97 ± 0,10
Oxígeno (%)	97,32 ± 2,88
NH ₄ ⁺ (mg/L)	0
NO ₂ (mg/L)	0
PO ₄ (mg/L)	0

Ejemplares de estudio

Los ejemplares fueron obtenidos del mismo stock del IEO, empleando las mismas técnicas descritas para el anterior experimento. Se obtuvieron individuos de entre 50 y 70 mg de peso húmedo, que fueron sembrados a una densidad de 10 individuos por cilindro (1000 ind/m²) con una biomasa media por cilindro de 603,33 ± 24,67 mg.

Alimentación y crecimiento

Los poliquetos del tratamiento “pienso” fueron alimentados con pienso comercial de lenguado SKRETTING®, bajo un régimen de alimentación diario de un 4% de la biomasa total de poliquetos. Los tratamientos “BC”, “BC1/2”, “BC2” y “BC4” consistían en una dieta a base de bagazo de cerveza Rocker Beer® (Figura 5), que era homogeneizada en una proporción de 200 mg de bagazo por cada 100 mL de agua de mar. La cantidad de bagazo administrada en el tratamiento “BC” fue equivalente, en materia orgánica, a la de alimento comercial del tratamiento “pienso”, para lo que se determinó la humedad y el contenido de materia orgánica en los dos tipos de alimento. Para ello, se tomaron 3 muestras de 5 g de bagazo y pienso que se depositaron en cápsulas de cerámica y fueron sometidas a una desecación durante 24 horas a 105°C en una estufa P.Selecta® 237 (Selecta, Barcelona, España) para la obtención del peso

seco, y posterior incineración durante 6 horas a 450°C en un horno de mufla Hobersal® HK-11 (Hobersal, Barcelona, España), para determinar el contenido en materia orgánica en base al peso de las cenizas. A partir de estos datos, se halló el porcentaje de humedad y de materia orgánica de pienso y bagazo mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Materia orgánica}(g) = (\text{Peso cápsula} + \text{muestra seca a } 105^{\circ}\text{C}) - (\text{Peso cápsula} + \text{muestra calentada a } 450^{\circ}\text{C})$$

$$\text{Materia orgánica}(\%) = \frac{\text{Materia orgánica}(g)}{\text{Muestra seca a } 105^{\circ}\text{C}} \times 100$$

$$\text{Peso Humedad}(g) = (\text{Peso cápsula} + \text{muestra húmeda}) - (\text{Peso cápsula} + \text{muestra seca } 105^{\circ}\text{C})$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso humedad}(g)}{\text{Peso muestra húmeda}} \times 100$$



Figura 5. Bagazo de cerveza.

Igual que en el experimento anterior, la cantidad de alimento suministrado a los poliquetos experimentales se calculó teniendo en cuenta la tasa de crecimiento diario, SGR, repartiendo la

cantidad total correspondiente a cada semana en dos veces. A los 14 días de experimentación, se realizó un muestreo de peso de los 10 ejemplares de cada cilindro y se calculó la SGR para cada dieta y aunque los resultados fueron distintos para cada tratamiento, se estimó calcular la el alimento a administrar con una SGR del 5% d⁻¹, para no frenar un posible crecimiento de los ejemplares. Tras 30 días de experimento, se realizó un muestreo final de biomasa de todos los cilindros y con los datos de peso húmedo de cada individuo obtenidos en los 3 muestreos, se obtuvieron los pesos medios por cilindro y se calculó los SGR1, SGR2 SGRT y DGR para cada tratamiento.

Después del último muestreo, se mantuvieron los individuos durante 24 horas en ayunas en recipientes con agua, sin sedimento, y transcurrido ese periodo se procedió a su ultracongelación a -80°C y a su almacenamiento a esta temperatura hasta los subsiguientes análisis bioquímicos.

3.2. Análisis lipídico

3.2.1. Extracción y purificación de lípidos

El análisis bioquímico de las muestras recogidas se llevó a cabo en los laboratorios de la UD Fisiología del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Universidad de La Laguna. La extracción del lípido total de los diferentes alimentos (pienso y bagazo), así como de los poliquetos sometidos a distintos tratamientos experimentales, fue realizada siguiendo el método descrito por Folch et al. (1957). En un primer paso, los lípidos fueron extraídos por homogeneización de 500-1000 mg de tejido con 10 mL de cloroformo:metanol (CL:MET) a una proporción de 2:1 (v/v), y posterior filtración a través de un filtro de 9 cm de diámetro, espesor de 0,17 mm y un tamaño de poro de 14-18 µm, cuya finalidad era eliminar restos de tejido. A continuación, se añadió un cuarto del volumen de KCl (0,88% p/v), se agitó vigorosamente la mezcla, y se centrifugó a 1700 rpm durante 5 minutos. Como resultado de la centrifugación, se obtuvieron dos fases completamente diferenciadas, la fase inferior, correspondiente al CL:MET (2:1 v/v) que contenía el lípido, y una fase superior con los compuestos no lipídicos, que fue desechada. La fase inferior fue trasvasada a un nuevo tubo de ensayo y evaporada bajo atmósfera de nitrógeno, siendo posteriormente trasvasado todo el lípido depositado tras la evaporación a un bote pequeño, previamente pesado, junto con un pequeño volumen de CL:MET. Nuevamente se evaporó el CL:MET en su totalidad y los

pequeños botes fueron dejados al vacío en oscuridad durante 14-18 h para así estimar el peso del lípido total extraído por gravimetría. Tras la toma de peso, los lípidos fueron redisueltos en una mezcla de CL:MET (2:1) con antioxidante BHT (butilhidroxitolueno, 0,01%) a una concentración de 10 mg/mL, y se conservaron a -20°C en atmósfera de nitrógeno hasta continuar con el siguiente análisis.

El porcentaje del lípido en peso húmedo se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lípido en peso húmedo} = \frac{\text{peso lípido}}{\text{peso muestra húmeda (mg)}} \times 100$$

Para calcular la humedad del tejido, se tomó una muestra de peso conocido del mismo y fue secada a 100°C durante 24 h. A continuación, se dejó enfriar la muestra en un desecador durante 15 minutos y se tomó de nuevo el peso. El contenido de humedad del tejido se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de humedad} = 100 - \left(\frac{100 \times \text{peso muestra seca (mg)}}{\text{peso muestra húmeda (mg)}} \right)$$

Finalmente, se calculó el porcentaje de lípido en peso seco de las muestras teniendo en cuenta el lípido en peso fresco y la humedad de la misma, mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lípido en peso seco} = \frac{\text{peso lípido (mg)} \times 100}{\frac{\text{peso muestra húmeda (mg)} \times (100 - \% \text{ humedad})}{100}}$$

3.2.2. Transmetilación de lípidos y obtención de los ésteres metílicos de ácidos grasos

Para la obtención de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, *del inglés Fatty Acid Methyl Esters*), se realizó un proceso de transmetilación por catálisis ácida de una alícuota de lípido total década muestra. Los FAME son volátiles y pueden ser inyectados en el cromatógrafo de gases. Para ello, se tomó una alícuota de 1 mg de lípido total y se le adicionó un 5% de un estándar interno, concretamente el ácido graso nonadecanoico (19:0). Seguidamente, se añadió 1 mL de tolueno, facilitando así la disolución de los lípidos menos

polares, y 2 mL de metanol en ácido sulfúrico al 1% (MeOH: H₂SO₄) que actúa como agente metilante, dejándose reaccionar la mezcla durante 16 horas a 50°C, en una manta calefactora en presencia de atmósfera de nitrógeno.

Pasado ese tiempo, se dejó enfriar la muestra y se le añadió 2 mL de KHCO₃ al 2% y 5 mL de hexano: dietil-éter (HEX:ETER) a una proporción 1:1, agitando vigorosamente la mezcla y centrifugándola a 1500 rpm durante 5 min. Seguidamente, se recuperó la fase superior y se depositó en tubo de ensayo limpio. A la fase inferior se le volvió a añadir otros 5 mL de HEX: ETER y tras su centrifugación, se recuperó nuevamente la fase superior que fue añadida al tubo limpio anterior. El contenido del tubo fue evaporado en atmósfera de nitrógeno con el fin de eliminar el solvente, y una vez evaporado en su totalidad, la muestra fue resuspendida en 100 µL de hexano. Para la purificación de los FAME se utilizó una cromatografía en capa fina (TLC *del inglés Thin Layer Chromatography*,) y se empleó como solvente una mezcla de hexano, dietil-éter y ácido acético (90:10:1, v/v/v). Para ello, se usaron placas de sílice de 20 x 20 cm x 0,25mm Macherey-Nagel Polygram SIL G® (Düren, Alemania) donde se inyectaron las diferentes muestras a una concentración de 1 mg/cm y un estándar de FAME que, una vez desarrolladas las placas, fue revelado con iodina y CHCl₃ al 1%. De esta manera, se localizaron las bandas con la posición de los ácidos grasos metilados en la placa, las cuales se rasparon, purificaron y se disolvieron en hexano de altísima pureza con BHT dentro de pequeños botes de 1,7 mL de capacidad. Estos botes fueron conservados en atmósfera de nitrógeno a -20°C hasta su inyección en el cromatógrafo de gases.

3.2.3. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases (GC-ULTRA TRACE; Thermo Scientific, Milán, Italia) con inyección en columna y detector de ionización de llama (FID, *del inglés Flame Ionitiation Detector*) bajo las siguientes condiciones analíticas:

- Columna de sílice fundida SupelcowaxTM 10 (30 m x 0,32 mm I.D, 0,25µm de espesor) (Supelco Inc., Bellefonte, EEUU) con fase estacionaria polar.
- El flujo de los gases del aparato es: helio, 1,5 ml/min; hidrógeno, 35 ml/min; aire, 350 ml/min. El helio actúa como gas portador.
- Temperatura: Inyector (on column) 50°C; Detector (FID) 240°C; Columna con rampas de temperatura con las siguientes características: temperatura inicial 50°C, tasa de 21 incremento de temperatura de 40°C/min hasta alcanzar 150°C, segunda de tasa de incremento de 2°C/min

llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, *del inglés High-Performance Thin Layer Chromatography*) en placas de 10 x 10 cm y 0,25 mm de grosor con sílica gel 60, siguiendo el método de Olsen y Henderson (1989). En ellas se añadió 10 µg de un estándar externo de composición conocida consistente en lípido extraído de huevo de bacalao disuelto en cloroformo-metanol (2:1, v/v) con 0,01% BHT, y 20 µg de lípido de cada muestra. Se analizaron entre 4 y 6 muestras en cada placa. Después de añadir todas las muestras, se aplicó a la placa un doble desarrollo, sumergiéndola en una disolución para separar los lípidos polares, consistente en isopropanol, cloroformo, metilacetato, metanol y KCl al 0,25% (5:5:5:2:1,8, por volumen). Cuando las placas se desarrollaron hasta la mitad, fueron ventoiladas bajo campana extractora durante 5 minutos para eliminar posibles restos de solventes. Posteriormente, fueron nuevamente introducidas en una cubeta conteniendo una disolución de hexano, éter y ácido acético (20:5:0,5, por volumen) para separar los lípidos neutros, dejándola desarrollar hasta 0,5 cm de la parte superior. Tras finalizar el desarrollo de las placas, se tiñeron de forma homogénea con una solución de acetato cúprico y ortofosfórico en metanol, y se introdujeron en una estufa a 160°C durante 15 minutos (Figura 7). Se dejaron enfriar y se escanearon en un CAMAG TLC Visualizer (CAMAG, Muttenz, Suiza) a través del software winCATS versión 1.4.4. Mediante este programa, se identificaron y determinaron las diferentes clases lipídicas por densitometría que fueron cuantificadas en porcentaje de área. Los datos obtenidos fueron volcados a una hoja de cálculo con la que se trabajaría más adelante en el análisis estadístico.

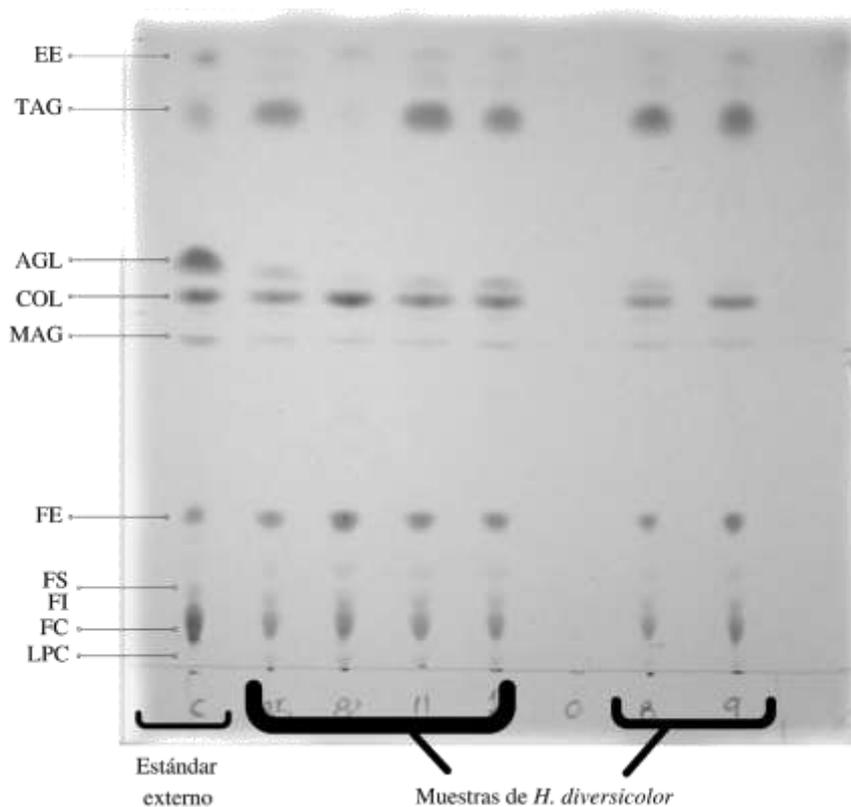


Figura 7. Distribución de las clases lipídicas de muestras de *Hediste diversicolor* en una placa de sílica gel. EE, ésteres de estero; TAG, triglicéridos; AGL, ácidos grasos libres; COL, colesterol; MAG, monoacilglicéridos; FE, fosfatidiletanolamina; FS, fosfatidilserina; FI, fosfatidilinositol; FC, fosfatidilcolina; LPC, lisofosfatidilcolina.

3.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos a lo largo de esta memoria se presentan como media \pm desviación estándar (DE) para un número variable de réplicas ($n=5$, para el experimento de temperatura y $n=3$ para el experimento de alimentación, salvo que se indique lo contrario). Previamente al desarrollo de los tests estadísticos correspondientes, se verificó la normalidad de los datos mediante el test de Shaphiro-Wilk (Zar, 1999) y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levenne. En el caso de que no se cumpliera alguna de estas dos asunciones, se aplicó las siguientes transformaciones estabilizadoras de los datos: arcoseno de la raíz cuadrada, la inversa y la logarítmica. Cuando las transformaciones aplicadas no tuvieron éxito, se aplicó el test de Welch, seguido del test T3 de Dunnett en el experimento de alimentación.

Las diferencias significativas para las tasas de crecimiento específicas (SGR), contenido de lípido total, composición de clases lipídicas y perfil de ácidos grasos entre los tratamientos

“agua fría” y “agua cálida” se llevó a cabo mediante el test de la t-Student para muestras independientes o la U-Mann-Whitney, para distribuciones de datos normales o no normales, respectivamente. En el experimento de alimentación, las diferencias significativas para las tasas de crecimiento específicas (SGR), contenido de lípido total, composición de clases lipídicas y perfil de ácidos grasos entre los 6 tratamientos experimentales fueron determinadas mediante una ANOVA de un factor, seguida del test *post-hoc* de Tukey HSD.

Para todos los test aplicados, las diferencias fueron consideradas significativas para valores de $p < 0,05$. La totalidad del estudio estadístico se llevó a cabo con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics v21.0 (IBM Corp., Nueva York, USA) para Windows.

4. Resultados

4.1. Experimento: Cultivo de ejemplares bajo dos temperaturas

4.1.1. Crecimiento de poliquetos

La supervivencia final de los ejemplares cultivados de *Hediste diversicolor* fue del 100% para ambos tratamientos. Los datos de la SGR1, SGR2, SGRT y DGR determinados para los poliquetos cultivados bajo los tratamientos “agua fría” y “agua cálida” se muestran en la Tabla 3, siendo significativamente mayores todos ellos en el tratamiento de agua cálida.

Tabla 3. Tasa de crecimiento específica (SGR) y tasa de crecimiento diaria (DGR) de *Hediste diversicolor* cultivados bajo dos regímenes de temperatura diferentes durante 35 días.

	Agua cálida	Agua fría	
SGR1 (% d ⁻¹)	7,57 ± 0,19	5,62 ± 0,32	*
SGR2 (% d ⁻¹)	4,76 ± 0,41	3,51 ± 0,17	*
SGRT (% d ⁻¹)	5,89 ± 0,26	4,36 ± 0,15	*
DGR (g d ⁻¹)	0,12 ± 0,01	0,06 ± 0,01	*

SGR1, SGR en los primeros 14 días de cultivo; SGR2, SGR en los segundos 21 días de cultivo; SGRT, SGR en los 35 días de cultivo. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar (n = 50).

* Indica diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

4.1.2. Composición lipídica de poliquetos

Se encontraron diferencias significativas en el contenido de lípido de los poliquetos cultivados a diferentes temperaturas (Tabla 4). Los organismos que fueron cultivados en el tratamiento “agua fría” contenían mayor porcentaje de lípido, tanto en peso fresco (p.f.) como en peso seco (p.s.), alcanzando valores de 1,76 ± 0,27% y 9,92 ± 1,88%, respectivamente, en comparación con aquellos cultivados en “agua cálida” que registraron valores de 1,37 ± 0,21% y 7,64 ± 1,19%, respectivamente.

Tabla 4. Contenido de lípido en peso fresco (p.f.) y en peso seco (p.s.) en *Hediste diversicolor* cultivados bajo dos regímenes de temperatura diferentes durante 30 días.

	Agua cálida	Agua fría	
% Lípido (p.f.)	1,37 ± 0,21	1,76 ± 0,27	*
% Lípido (p.s.)	7,64 ± 1,19	9,92 ± 1,88	*

Los resultados se muestran como media ± desviación estándar (n = 5). * Indica diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas para ninguna clase lipídica entre los dos tratamientos experimentales. Los valores obtenidos en el tratamiento de “agua cálida” fueron: 31,72% de triglicéridos (TAG); 21,31% de colesterol (COL); 12,12% de fosfatidiletanolamina (FE) y 12,86% de fosfatidilcolina (FC). Para el tratamiento “agua fría” los resultados fueron: 39,44% de TAG; 17,45% de COL; 9,99% de FE y 11,44% de FC.

En ambos casos, predominaron los lípidos neutros, con valores cercanos al 70% del total de lípido, debido principalmente al contenido de TAG y COL (Figura 8). Dentro de los lípidos polares, las fracciones lipídicas más destacadas fueron la FC y la fosfatidiletanolamina FE, que representaron, cerca del 75% del total de los lípidos polares.

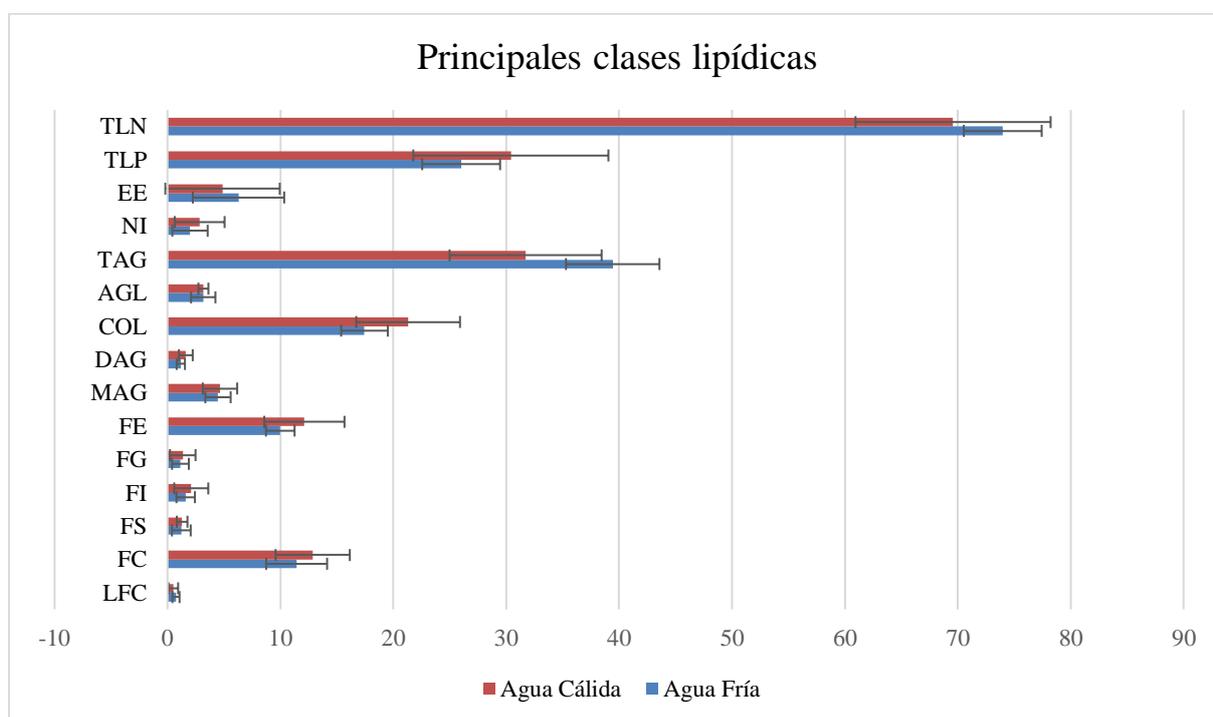


Figura 8. Principales clases lipídicas (% lípido total) de *Hediste diversicolor* cultivados en condiciones de temperatura cálida (rojo) y fría (azul) durante 30 días. Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar (n = 5). TLN, total lípidos neutros; TLP, total lípidos polares; EE, ésteres de esterol; NI, no identificados; TAG, triglicéridos; AGL, ácidos grasos libres; COL, colesterol; DAG, diacilgliceridos; MAG, monoacilglicéridos; FE, fosfatidiletanolamina; FG, fosfatidilglicerol; FI, fosfatidilinositol; FS, fosfatidilserina; FC, fosfatidilcolina y LFC, lisofosfatidilcolina.

La Tabla 5 muestra que la composición en ácidos grasos de los poliquetos cultivados bajo los dos regímenes de temperatura, presentó numerosas diferencias significativas. Así, el tratamiento de agua fría dio lugar a una mayor abundancia de todas las familias de ácidos grasos, que presentaron el siguiente orden creciente de concentración: poliinsaturados (PUFA) >

monoinsaturados (MUFA) > saturados (SFA). La cantidad de n-3 LC-PUFA también mayor en este tratamiento con $27,26 \pm 10,15$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco, frente a los $10,69 \pm 1,25$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco del tratamiento agua cálida.

Independientemente del régimen de temperatura, el AG más abundante de la familia de los saturados fue el ácido palmítico (16:0), presentando $6,33 \pm 0,83$ y $12,07 \pm 4,71$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco en los tratamientos de agua cálida y fría, respectivamente. El ácido oleico (18:1n-9) fue el más abundante dentro de los monoinsaturados, siendo mayor en agua fría con un valor de $10,14 \pm 4,02$, en contraste con $3,70 \pm 0,72$ en agua cálida. Dentro los LC-PUFA, es importante resaltar la mayor presencia de AG pertenecientes a la serie n-3 que los de la serie n-6 en ambos tratamientos experimentales. Así, el AG más abundante dentro de este grupo fue el EPA (20:5n-3) con valores significativamente mayores en el tratamiento de agua fría ($13,43 \pm 5,04$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) frente al de agua cálida ($5,90 \pm 0,60$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco), seguido del DHA (22:6n-3) con $10,02 \pm 3,82$ y $3,59 \pm 0,58$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco, respectivamente. En cuanto a la serie n-6, destacar que el 22:5n-6 estuvo presente en pequeña cantidad ($0,19 \pm 0,03$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) en el tratamiento de “agua cálida, mientras que en el de “agua fría” no fue detectado. Dentro de este grupo, los representantes más abundantes fueron el ácido linoleico (18:2n-6) y el 20:2n-6, mientras que el ARA (20:4n-6) presentó valores de $0,64 \pm 0,07$ y $1,30 \pm 0,47$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco en el tratamiento de agua cálida y fría, respectivamente.

Por último, destacar que las proporciones n-3/n-6 y DHA/EPA, fueron significativamente más elevadas en el tratamiento de agua fría ($2,07 \pm 0,08$ y $0,74 \pm 0,06$ vs. $1,89 \pm 0,10$ y $0,59 \pm 0,7$, respectivamente).

Tabla 5. Composición de ácidos grasos (μg ácido graso/mg peso seco) de *Hediste diversicolor* cultivados bajo dos regímenes de temperatura diferentes durante 30 días.

Ácidos grasos	Agua cálida	Agua fría	
Total SFA	9,08 \pm 1,07	18,04 \pm 6,96	*
14:0	0,61 \pm 0,11	1,61 \pm 0,60	*
15:0	0,24 \pm 0,07	0,46 \pm 0,17	
16:0	6,33 \pm 0,83	12,07 \pm 4,71	*
17:0	0,27 \pm 0,03	0,58 \pm 0,23	*
18:0	1,63 \pm 0,11	3,32 \pm 1,29	*
Total MUFA	11,88 \pm 1,14	30,80 \pm 11,93	*
16:1n-9	0,10 \pm 0,08	0,37 \pm 0,35	
16:1n-7	1,40 \pm 0,23	4,38 \pm 1,63	*
17:1n-7	0,21 \pm 0,19	0,80 \pm 0,56	
18:1n-11	1,16 \pm 0,10	2,98 \pm 1,17	*
18:1n-9	3,70 \pm 0,72	10,14 \pm 4,02	*
18:1n-7	1,74 \pm 0,21	3,97 \pm 1,51	*
20:1n-11	0,85 \pm 0,05	1,52 \pm 0,61	
20:1n-9	1,46 \pm 0,21	2,95 \pm 1,18	*
20:1n-7	0,18 \pm 0,17	0,57 \pm 0,32	*
20:1n-5	0,73 \pm 0,08	1,50 \pm 0,59	
22:1n-11	0,51 \pm 0,14	0,98 \pm 0,67	*
Total n-6 PUFA	6,02 \pm 0,73	14,16 \pm 5,26	*
18:2n-6	2,79 \pm 0,58	8,29 \pm 3,19	*
20:2n-6	2,11 \pm 0,45	3,83 \pm 1,45	*
20:4n-6 (ARA)	0,64 \pm 0,07	1,30 \pm 0,47	*
22:4n-6	0,46 \pm 0,04	0,66 \pm 0,20	
22:5n-6	0,19 \pm 0,03	ND	*
Total n-3 PUFA	11,36 \pm 1,35	29,38 \pm 10,90	*
18:3n-3	0,50 \pm 0,07	1,43 \pm 0,52	*
18:4n-3	0,20 \pm 0,05	0,69 \pm 0,24	*
20:3n-3	0,17 \pm 0,08	0,52 \pm 0,17	*
20:5n-3 (EPA)	5,90 \pm 0,60	13,43 \pm 5,04	*
21:5n-3	0,52 \pm 0,11	0,90 \pm 0,31	*
22:5n-3	0,96 \pm 0,12	1,91 \pm 0,72	*
22:6n-3 (DHA)	3,59 \pm 0,58	10,02 \pm 3,82	*
Total PUFA	17,59 \pm 2,06	44,11 \pm 16,33	*
20:2n-9	0,23 \pm 0,04	0,57 \pm 0,20	*
n-3 LC-PUFA	10,69 \pm 1,25	27,26 \pm 10,15	*
n-6 LC-PUFA	3,37 \pm 0,58	5,87 \pm 2,09	*
ARA/EPA	0,12 \pm 0,02	0,10 \pm 0,00	
DHA/EPA	0,59 \pm 0,07	0,74 \pm 0,06	*
n-3/n-6	1,89 \pm 0,10	2,07 \pm 0,08	*

Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar (n = 5). SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (\geq C20 y \geq 3 dobles enlaces). ND, no detectado. * Indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2. Experimento: Cultivo de ejemplares con diferentes dietas

4.2.1. Composición lipídica del alimento

Se analizaron los % de las principales clases lipídicas contenidas en los dos alimentos suministrados a *H. diversicolor* en el presente estudio, el bagazo de cerveza y el pienso comercial (Figura 9). En el caso del pienso predominaron los lípidos neutros (40,64 ± 6,31%), mientras que el bagazo presentó valores bastante más bajos (19,40 ± 3,32%). Los ésteres de colesterol (EE) junto con los triglicéridos (TAG) fueron las clases menos abundantes en ambos alimentos, siendo en el bagazo superior. Hay una notable diferencia entre ambos alimentos en la proporción de ácidos grasos libres (AGL), que en el pienso es notablemente superior (37,07 ± 5,21%) mientras que el bagazo es de 8,90 ± 3,64%. De igual forma ocurre con el colesterol (COL), que en el pienso presenta valores de 34,60 ± 8,75% y en bagazo de 15,24 ± 3,98%.

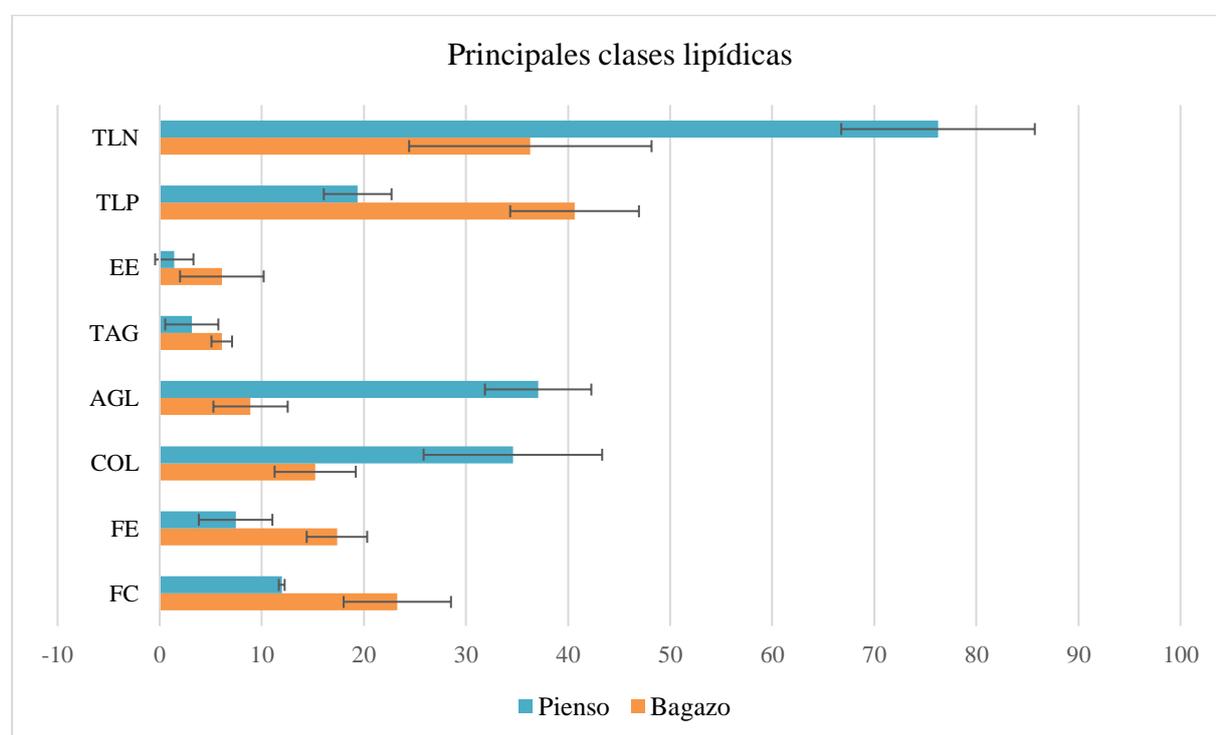


Figura 9. Principales clases lipídicas (% lípido total) de los alimentos bagazo de cerveza y pienso empleado en este estudio. Los resultados se presentan como media ± desviación estándar (bagazo, n = 3; pienso, n = 2). TLN, total lípidos neutros; TLP, total lípidos polares; EE, ésteres de esterol; TAG, triglicéridos; AGL, ácidos grasos libres; COL, colesterol; FE, fosfatidiletanolamina; FC, fosfatidilcolina.

En la Tabla 6 se muestra la composición de los ácidos grasos de los alimentos suministrados: el bagazo de cerveza y el pienso comercial acuícola.

El bagazo de cerveza presentó el siguiente orden creciente de concentración de las familias de ácidos grasos: poliinsaturados (PUFA) > saturados (SFA) > monoinsaturados (MUFA). Por el contrario, el alimento de pienso presentó mayores proporciones de PUFA, con el siguiente orden: saturados (SFA) > monoinsaturados (MUFA) > poliinsaturados (PUFA). Varios de los PUFA no se encontraron presentes en el bagazo, entre ellos el ácido araquidónico (20:4n-6).

En cuanto a la proporción total de n-3 LC-PUFA, como era de esperar, el pienso mostró una proporción mayor que la del bagazo, $8,25 \pm 0,62\%$ frente a $0,43 \pm 0,24\%$. El ácido eicosapentaenoico (20:5n-3) presentó una mayor abundancia en el pienso ($5,62 \pm 0,26\%$) frente al bagazo ($0,28 \pm 0,16\%$). De la misma forma ocurrió con el ácido docosahexaenoico (22:6n-3) que la proporción en pienso fue de $8,09 \pm 0,60$ mientras que en el bagazo fue de $0,19 \pm 0,10$.

Tabla 6. Ácidos grasos presentes en los alimentos suministrados en el presente estudio: bagazo de cerveza y pienso comercial acuícola (% de ácidos grasos totales).

Ácidos grasos	Alimento bagazo	Alimento pienso
Total SFA	28,09 ± 1,04	40,06 ± 1,21
14:0	0,45 ± 0,07	5,80 ± 0,26
15:0	0,59 ± 0,28	1,25 ± 0,02
16:0	24,58 ± 0,56	26,48 ± 0,80
17:0	0,13 ± 0,01	0,76 ± 0,03
18:0	2,02 ± 0,19	5,38 ± 0,16
20:0	0,32 ± 0,02	0,39 ± 0,01
Total MUFA	12,49 ± 0,20	29,04 ± 0,41
16:1n-9	0,14 ± 0,02	0,28 ± 0,01
16:1n-7	0,34 ± 0,12	6,14 ± 0,05
16:1n-11	0,07 ± 0,07	0,15 ± 0,21
17:1n-7	ND	0,13 ± 0,18
18:1n-5	0,04 ± 0,07	0,15 ± 0,21
18:1n-9	9,51 ± 0,23	13,67 ± 0,02
18:1n-7	0,90 ± 0,06	2,81 ± 0,01
20:1n-11	0,07 ± 0,06	0,41 ± 0,02
20:1n-9	0,72 ± 0,03	2,10 ± 0,02
22:1n-11	0,27 ± 0,09	1,98 ± 0,05
20:1n-9	0,33 ± 0,11	0,44 ± 0,05
24:1n-9	0,10 ± 0,08	0,78 ± 0,05
Total n-6 PUFA	51,30 ± 1,50	10,76 ± 0,33
18:2n-6	50,96 ± 1,57	9,72 ± 0,26
20:2n-6	0,20 ± 0,02	0,36 ± 0,08
20:4n-6 (ARA)	ND	0,69 ± 0,01
22:4n-6	0,15 ± 0,10	ND
Total n-3 PUFA	6,19 ± 0,07	17,43 ± 1,18
18:3n-3	5,64 ± 0,28	1,52 ± 0,04
18:4n-3	0,08 ± 0,08	1,08 ± 0,16
20:4n-3	ND	0,39 ± 0,06
20:5n-3 (EPA)	0,28 ± 0,16	5,62 ± 0,26
22:5n-3	ND	0,73 ± 0,05
22:6n-3 (DHA)	0,19 ± 0,10	8,09 ± 0,60
Total PUFA	57,49 ± 1,52	28,53 ± 0,96
16:4n-1	ND	0,34 ± 0,11
n-3 LC-PUFA	0,43 ± 0,24	8,25 ± 0,62
n-6 LC-PUFA	0,14 ± 0,09	0,62 ± 0,01
ARA/EPA	0,12 ± 0,00	1,62 ± 0,16
DHA/EPA	ND	0,12 ± 0,00
n-3/n-6	0,73 ± 0,10	1,44 ± 0,04

Los resultados se muestran como media ± desviación estándar (n= 3, alimento bagazo; n=2, alimento pienso). SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ($\geq C20$ y ≥ 3 dobles enlaces). ND, no detectado.

4.2.2. Crecimiento de poliquetos

La supervivencia de los ejemplares de los 6 tratamientos al final del periodo experimental fue del 100%, aunque algunos ejemplares del tratamiento “inanición” presentaron mal aspecto con metámeros de color negro. Los datos de la SGR1, SGR2 y SGRT determinados para los poliquetos cultivados en el experimento de diferentes dietas (inanición; BC1/2; BC; BC2; BC4 y pienso) se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Tasa de crecimiento específica (SGR) de *Hediste diversicolor* mantenidos en inanición, o alimentado con 4 concentraciones de bagazo o con pienso comercial acuícola durante 30 días.

	Inanición	BC1/2	BC	BC2	BC4	Pienso
SGR1 (% d ⁻¹)	0,85 ± 0,32a	2,49 ± 0,43b	3,39 ± 0,67bc	3,82 ± 0,34cd	4,50 ± 0,33cd	5,01 ± 0,40e
SGR2 (% d ⁻¹)	-0,16 ± 1,32a	1,07 ± 0,98b	2,30 ± 0,17b	3,42 ± 0,16b	3,79 ± 0,45b	4,87 ± 0,32b
SGRT (% d ⁻¹)	0,36 ± 0,68a	1,80 ± 0,28b	2,86 ± 0,28c	3,63 ± 0,16cd	4,16 ± 0,21de	4,94 ± 0,40e

SGR1, SGR en los primeros 14 días de cultivo; SGR2, SGR en los segundos 21 días de cultivo; SGRT, SGR en los 35 días de cultivo. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar (n = 50). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

El tratamiento que mostró una tasa de crecimiento menor, incluso negativa en el segundo periodo de crecimiento, fue el de “inanición”, mientras que los poliquetos que recibieron pienso como alimento, presentaron los mayores valores de SGR, seguido del tratamiento “BC4”, la dieta con mayor proporción de bagazo. Los resultados muestran que, a la vez que se incrementa la cantidad de bagazo también lo hace la SGR (Figura 10).

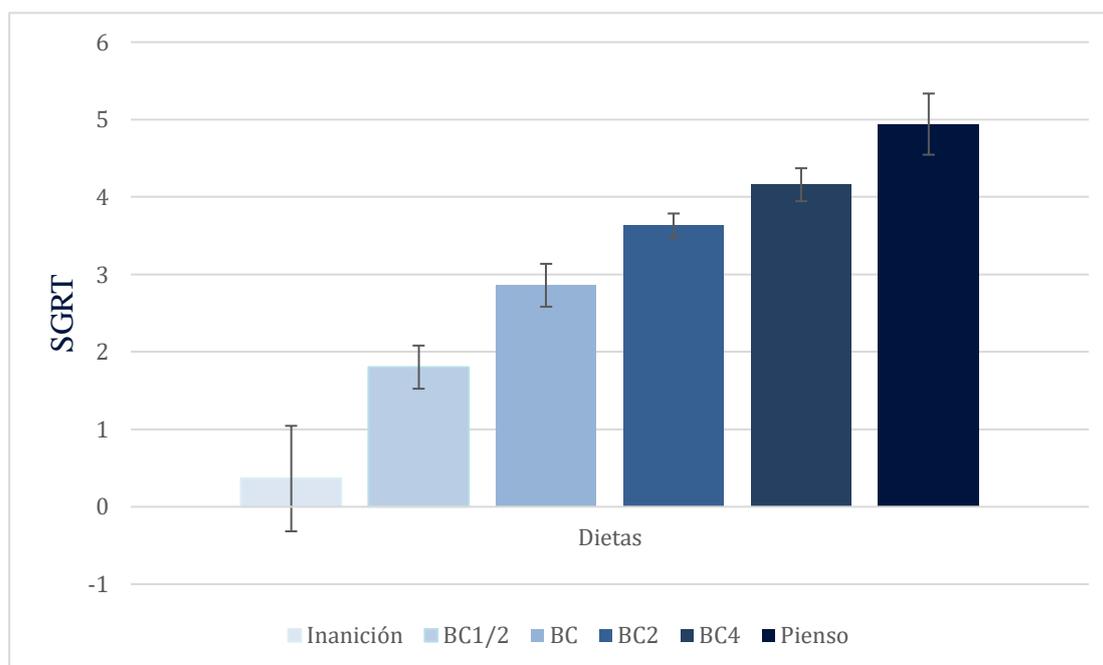


Figura 10. Tasa de crecimiento diario SGR ($\%d^{-1}$) de *Hediste diversicolor* mantenidos en inanición, o alimentado durante 30 días con diferentes dietas. Inanición, sin suministro de alimento; BC1/2, la mitad de bagazo que el tratamiento BC; BC, bagazo equivalente en materia orgánica y humedad al suministrado en el tratamiento pienso; BC2, el doble de bagazo que el tratamiento BC; BC4, cuatro veces la cantidad de bagazo que el tratamiento BC; Pienso, pienso comercial acuícola. Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar (n = 30).

4.2.3. Composición lipídica de poliquetos

Las diferencias significativas encontradas en el contenido total de lípidos, tanto en peso fresco (p.f.) como en peso seco (p.s.), entre los poliquetos que ingirieron las diferentes dietas experimentales aparecen reflejadas en la Tabla 8. Los individuos que se mantuvieron en condiciones de inanición, presentaron un porcentaje de lípido en p.s. y p.f. significativamente más bajo que aquellos que ingirieron las dietas de bagazo “BC”, “BC2” y “BC4”. Curiosamente, el contenido lipídico de los poliquetos alimentados con pienso presentó valores similares a los de ejemplares mantenidos en inanición.

Tabla 8. Contenido de lípido en peso fresco (p.f.) y en peso seco (p.s.) en *Hediste diversicolor* mantenidos en inanición, alimentado con 4 concentraciones de bagazo o con pienso comercial acuícola durante 30 días.

	Inanición	BC1/2	BC	BC2	BC4	Pienso
% Lípido (p.f.)	1,23 \pm 0,07a	1,60 \pm 0,07ab	1,72 \pm 0,25b	1,68 \pm 0,08b	1,82 \pm 0,22b	1,54 \pm 0,20ab
% Lípido (p.s.)	9,97 \pm 0,90a	9,05 \pm 0,82ab	9,05 \pm 1,33b	9,72 \pm 0,18b	11,12 \pm 0,71b	8,96 \pm 1,05ab

Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar (n = 3). Letras diferentes en la misma fila representan diferencias significativas entre poliquetos (p<0,05).

Los resultados obtenidos en el análisis de clases lipídicas muestran diferencias significativas entre algunas dietas en TLP, FFA, TAG y TLP (Tabla 9). En todas las dietas predominaron los lípidos neutros. El valor más bajo lo obtuvo el tratamiento “inanición” con un 60,30% y el más alto el tratamiento “BC4” con un valor de 75,77%, muy similar al del tratamiento “BC2” (75,65%). El alto valor de lípidos neutros se debió principalmente al COL y TAG. Es destacable que todas las dietas el % de TAG fue superior al de COL, con la excepción del tratamiento “inanición” que el COL (29,16%) superó al de TAG (10,97%). De este modo el tratamiento “inanición” fue significativamente diferente al del resto de tratamientos

Tabla 9. Principales clases lipídicas (% del lípido total) de *Hediste diversicolor* mantenidos en inanición, o alimentado con 4 concentraciones de bagazo o con pienso comercial acuícola durante 30 días.

	Inanición	BC1/2	BC	BC2	BC4	Pienso
LFC	1,65 ± 0,65	0,48 ± 0,40	0,72 ± 0,53	0,30 ± 0,24	0,60 ± 0,61	0,79 ± 0,82
FC	15,12 ± 4,73	15,12 ± 6,71	9,32 ± 1,12	10,79 ± 1,34	9,83 ± 1,15	14,01 ± 4,92
FS	1,58 ± 0,44	1,77 ± 1,02	1,33 ± 1,04	1,07 ± 0,65	1,11 ± 0,88	1,22 ± 0,15
FI	2,09 ± 2,33	2,29 ± 1,12	1,26 ± 0,73	1,53 ± 0,85	1,70 ± 1,11	2,79 ± 0,88
FG	2,61 ± 2,09	1,07 ± 0,68	2,80 ± 1,06	1,74 ± 0,52	1,78 ± 0,47	1,52 ± 0,19
FE	15,84 ± 5,16	14,12 ± 4,61	9,86 ± 1,65	8,70 ± 2,74	9,07 ± 1,56	12,46 ± 2,45
TLP	39,70 ± 14,17b	35,00 ± 10,85ab	26,04 ± 3,75a	24,35 ± 4,26a	24,23 ± 4,11a	32,97 ± 5,75ab
MAG	5,16 ± 1,10	3,63 ± 0,57	3,75 ± 0,35	3,71 ± 0,47	4,22 ± 0,89	5,04 ± 1,21
DAG	1,49 ± 0,83	2,74 ± 1,15	2,22 ± 0,65	2,78 ± 2,60	1,58 ± 0,45	1,61 ± 0,38
COL	29,16 ± 4,92a	21,30 ± 0,01b	18,95 ± 0,33b	17,56 ± 1,66b	15,89 ± 3,03b	17,99 ± 1,49b
AGL	4,54 ± 0,89ab	7,58 ± 2,61b	7,32 ± 1,77ab	4,76 ± 1,25ab	4,59 ± 0,76ab	3,15 ± 1,05a
TAG	10,97 ± 11,08a	30,94 ± 4,38b	34,69 ± 5,01b	40,23 ± 6,71b	39,74 ± 4,46b	30,79 ± 4,66b
NI	1,93 ± 2,43	2,16 ± 1,35	3,27 ± 0,22	3,21 ± 2,31	4,51 ± 0,16	2,88 ± 0,69
EE	7,06 ± 3,97	3,75 ± 2,92	3,76 ± 0,49	3,40 ± 1,94	5,24 ± 1,33	5,56 ± 0,87
TLN	60,30 ± 14,17a	65,00 ± 10,85ab	73,96 ± 3,75b	75,65 ± 4,26b	75,77 ± 4,11b	67,03 ± 5,75ab

Los resultados se presentan como media ± desviación estándar (n = 5). LFC, lisofosfatidilcolina; FC, fosfatidilcolina; FS, fosfatidilserina; FI, fosfatidilinositol; FG, fosfatidilglicerol; FE, fosfatidiletanolamina; MAG, monoacilglicéridos; DAG, diacilgliceridos; COL, colesterol; AGL, ácidos grasos libres; TAG, triglicéridos; EE, ésteres de esterol; TLP, total lípidos polares; TLN, total lípidos neutros. Letras diferentes en la misma fila representan diferencias estadísticamente significativas entre poliquetos (p<0,05).

La Tabla 10 muestra la composición de los ácidos grasos de los poliquetos cultivados bajo 6 dietas distintas en la que se observa que en el caso de algunos AG hubo diferencias significativas en cuanto a su abundancia entre dietas. El tratamiento “pienso” dio lugar a una mayor abundancia de todas las familias de ácidos grasos, que presentaron el siguiente orden creciente de concentración: poliinsaturados (PUFA) > monoinsaturados (MUFA) > saturados (SFA). La cantidad de n-3 LC-PUFA fue significativamente mayor en este tratamiento en que

la dieta fue pienso, mostrando valores de $20,66 \pm 8,58 \mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco, frente al resto de tratamientos, en los que el valor más alto de n-3 LC-PUFA lo obtuvo el tratamiento “BC2” con $8,39 \pm 2,28 \mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco.

Independientemente de la dieta suministrada, el AG más abundante de la familia de los saturados fue el ácido palmítico (16:0), en el que el tratamiento “inanición” presentó valores significativamente menores al resto ($3,74 \pm 1,09 \mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco) y el tratamiento “pienso” y “BC2” presentaron los valores más altos y significativamente distintos al resto, $10,76 \pm 4,29$ y $8,25 \pm 1,35 \mu\text{g}/\text{mg}$ respectivamente. Dentro de los PUFA es importante resaltar que los valores de totales de n-3LC-PUFA fueron significativamente más elevados en el tratamiento pienso ($20,66 \pm 8,58 \mu\text{g}/\text{mg}$). Y curiosamente los valores más bajos de estos importantes AG no se dieron en el tratamiento “inanición” sino en el tratamiento “BC” ($6,46 \pm 0,93 \mu\text{g}/\text{mg}$), aunque las diferencias no fueron significativas entre estos. Los valores más bajos obtenidos del ARA (20:4n-6) fueron de los tratamientos “pienso e inanición”. El valor de EPA fue significativamente mayor en el tratamiento “pienso” con un resultado de $10,85 \pm 4,11 \mu\text{g}/\text{mg}$. Con respecto al DHA (22:6n-3), el contenido más alto se encontró en el tratamiento “pienso” ($7,04 \pm 3,24 \mu\text{g}/\text{mg}$), siendo significativamente más elevado al resto de dietas, entre las que no se encontraron diferencias significativas.

Tabla 10. Composición de los principales ácidos grasos (μg ácido graso/mg peso seco) de *Hediste diversicolor* mantenidos en inanición, o alimentado con 4 concentraciones de bagazo o con pienso comercial acuícola durante 30 días.

	Inanición	BC1/2	BC	BC2	BC4	Pienso
Total SFA¹	5,72 \pm 1,37a	9,94 \pm 1,16ab	11,35 \pm 1,79ab	18,86 \pm 6,63b	11,61 \pm 8,83ab	13,37 \pm 4,00b
16:0	3,74 \pm 1,09a	7,21 \pm 0,81ab	8,25 \pm 1,35b	14,01 \pm 5,05b	9,89 \pm 8,54ab	10,76 \pm 4,29b
17:0	0,20 \pm 0,03	0,26 \pm 0,04	0,25 \pm 0,03	0,35 \pm 0,10	0,22 \pm 0,26	0,28 \pm 0,30
Total MUFA¹	7,24 \pm 1,46	9,87 \pm 1,18	10,34 \pm 1,51	16,61 \pm 5,83	13,33 \pm 11,90	21,79 \pm 8,93
18:1n-9	1,51 \pm 0,59a	3,39 \pm 0,49ab	3,95 \pm 0,73ab	6,18 \pm 2,31b	3,26 \pm 1,57ab	2,27 \pm 1,97ab
Total n-6PUFA¹	5,09 \pm 3,78a	18,4 \pm 2,51b	25,72 \pm 3,76b	43,29 \pm 16,36b	32,99 \pm 24,53b	11,48 \pm 4,59ab
18:2n-6	2,88 \pm 2,68a	13,8 \pm 1,79bc	18,96 \pm 2,94bc	32,08 \pm 12,39c	23,88 \pm 17,27bc	6,53 \pm 2,62ab
20:2n-6	1,27 \pm 0,69a	2,74 \pm 0,66ab	4,65 \pm 0,51b	7,37 \pm 3,05b	5,82 \pm 4,73b	3,42 \pm 1,47ab
20:4n-6 (ARA)	0,53 \pm 0,22	1,01 \pm 0,01	1,15 \pm 0,23	1,98 \pm 0,70	1,76 \pm 1,44	0,93 \pm 0,41
Total n-3PUFA¹	7,99 \pm 1,37	8,53 \pm 1,52	9,02 \pm 1,21	13,32 \pm 3,92	10,98 \pm 9,74	22,37 \pm 9,29
18:3n-3	0,44 \pm 0,37	1,66 \pm 0,25	2,56 \pm 0,3	4,87 \pm 1,85	3,83 \pm 2,83	1,25 \pm 0,52
20:5n-3 (EPA)	4,84 \pm 0,61ab	4,28 \pm 0,74a	3,89 \pm 0,59a	5,04 \pm 1,47ab	3,78 \pm 3,22a	10,85 \pm 4,11b
21:5n-3	0,41 \pm 0,09	0,47 \pm 0,07	0,50 \pm 0,09	0,47 \pm 0,45	0,47 \pm 0,59	0,92 \pm 0,32
22:6n-3 (DHA)	1,32 \pm 0,24a	1,27 \pm 0,34a	1,28 \pm 0,23a	1,62 \pm 0,59a	1,26 \pm 1,03a	7,04 \pm 3,24b
Total PUFA¹	13,25 \pm 5,15a	27,3 \pm 4,05ab	35,81 \pm 5,67ab	58,64 \pm 21,58b	45,84 \pm 36,69ab	35,33 \pm 14,93ab
n-3 LC-PUFA	7,55 \pm 1,05a	6,86 \pm 1,29a	6,46 \pm 0,93a	8,39 \pm 2,28a	6,52 \pm 5,87a	20,66 \pm 8,58b
n-6 LC-PUFA	0,94 \pm 0,41a	1,82 \pm 0,06ab	2,11 \pm 0,40ab	3,83 \pm 1,23b	3,28 \pm 2,60ab	1,54 \pm 0,63ab
ARA/EPA	0,11 \pm 0,03a	0,24 \pm 0,05ab	0,29 \pm 0,02bc	0,40 \pm 0,12bc	0,47 \pm 0,08c	0,09 \pm 0,02a
DHA/EPA	0,27 \pm 0,03a	0,29 \pm 0,03a	0,33 \pm 0,04a	0,32 \pm 0,02a	0,34 \pm 0,01a	0,63 \pm 0,08b
n-3/n-6	2,00 \pm 0,87c	0,46 \pm 0,03b	0,35 \pm 0,03ab	0,32 \pm 0,04a	0,31 \pm 0,05a	1,94 \pm 0,05c

Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar (n= 5). SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (\geq C20 y \geq 3 dobles enlaces). Letras diferentes en la misma fila representan diferencias estadísticamente significativas entre poliquetos ($p < 0,05$). ¹ No se muestran todos los AG en la tabla.

5. Discusión

El presente estudio ha evaluado y contrastado el incremento de biomasa del poliqueto *Hediste diversicolor* cultivado bajo diferentes condiciones experimentales de temperatura y alimento. La alimentación, conjuntamente con factores ambientales como la temperatura, han sido ampliamente descritos en la bibliografía como determinantes para el desarrollo de especies acuáticas en condiciones de estabulación, tanto vertebrados (Lund et al., 2020; Pérez et al., 2014), como invertebrados (Reis et al., 2021a). Aunque *H. diversicolor* presentó mejores tasas de crecimiento con el tratamiento de agua cálida, bajo condiciones de agua fría se obtuvieron valores de crecimiento también aceptables. Es por ello por lo que, cultivar esta especie en latitudes donde el agua de mar pueda encontrarse en rangos de temperatura próximos a los de la temporada fría ensayados en esta investigación (11-14°C), pudiera ser considerada una opción perfectamente válida para el cultivo en masa de esta especie, sin necesidad de calentamiento de agua. Nuestros resultados sugieren, por tanto, que las plantas de cultivo deberían evaluar el ahorro energético y sopesar el impacto ambiental generado por calentar agua en los sistemas de producción de *H. diversicolor*.

Hasta donde sabemos, se describe aquí, por primera vez, las tasas de crecimiento y la cantidad y perfil lipídico de *Hediste diversicolor* alimentado con bagazo de cerveza. En el experimento de alimentación, los poliquetos que mostraron mayor incremento de biomasa tras 30 días ensayo fueron los alimentados con pienso comercial acuícola, con una SGRT de $4,94 \pm 0,40\% \text{ d}^{-1}$, y los del tratamiento con la proporción de bagazo más elevada “BC4”, con valores de SGRT de $4,26 \pm 0,21\% \text{ d}^{-1}$. Por tanto, la tasa de crecimiento obtenida con bagazo de cerveza en proporción 4 veces superior al equivalente en materia orgánica al del pienso comercial, proporciona los mismos resultados de crecimiento que la del alimento comercial acuícola. Además, ambos alimentos obtuvieron resultados de crecimiento similares a los señalados en otros estudios en los que se habían probado dietas consistentes en pienso comercial de lenguado y de dorada o caballa congelada sin procesar (Santos et al., 2016). Los datos de crecimiento, unidos a la supervivencia de todos los ejemplares al final del periodo experimental, validan la utilización de bagazo de cerveza como alimento para esta especie desde un punto de vista de su producción.

Los resultados aquí obtenidos podrían considerarse, por lo tanto, como un interesante punto de partida para cultivar *H. diversicolor* con bagazo reciclado procedente de la industria cervecera con un propósito comercial, al menos, como cebo de pesca. La utilización en

acuicultura de dietas constituidas por subproductos generados de grandes sectores industriales, como es el cervecero, como alternativa a los ingredientes marinos, supone un impulso destacable de cara a la sostenibilidad ambiental de la actividad. La sustitución parcial de ingredientes marinos en las dietas reduciría el uso de harinas y aceite de pescado, y por consiguiente, el índice FIFO (Kok et al., 2020). De hecho, uno de los principales retos del sector acuícola hoy en día, y que ha requerido mayor esfuerzo investigador en las últimas décadas, es su sostenibilidad (Naylor et al., 2020). En este sentido, la sustitución de ingredientes de origen marino por otros más sostenibles ha sido centro de múltiples estudios científicos en los últimos años (Pérez et al., 2014; Ofori-Mensah et al., 2020). En definitiva, el empleo de subproductos como ingredientes de las dietas para las especies de cultivo, puede traducirse en una mejora económica tanto para la acuicultura como para la industria generadora de los subproductos, además de contribuir de manera notable a la sostenibilidad del sector acuícola.

Otro dato significativo a nivel productivo es que, independientemente del desarrollo experimental, nuestros resultados evidencian una mayor tasa de crecimiento de los ejemplares durante las primeras semanas de experimentación (SGR1, entre 5,0 y 7,6 % d⁻¹; SGR2, entre 3,5 y 4,9 % d⁻¹), por lo que parece recomendable la producción de biomasa de *H. diversicolor* en periodos de tiempo cortos, de 14-15 días, por las empresas productoras.

El poliqueto *Hediste diversicolor* es una especie novedosa y de elevado interés para la acuicultura debido a su alto contenido en n-3 LC-PUFA (Santos et al., 2016) y su potencial capacidad de síntesis *de novo* de ácidos grasos poliinsaturados (Jerónimo et al., 2021). Los LC-PUFA, y en especial, el DHA (22:6n-3), el EPA (20:5n-3) y ARA (20:4n-6), son AG particularmente importantes, ya que desempeñan papeles cruciales en procesos fisiológicos vitales (Glencross, 2009); estando implicados en el mantenimiento de la integridad y la fluidez de la bicapa lipídica, la regulación de la homeostasis, la respuesta inmune e inflamatoria, el funcionamiento de muchos órganos, la modulación de la expresión génica, etc. (Zárate et al., 2017).

Los poliquetos cultivados en agua fría mostraron un mayor porcentaje de lípido, tanto seco como húmedo, con respecto a los cultivados en agua cálida. Estos datos concuerdan y refuerzan el estudio realizado por Santos et al. (2016), en el cual se analizó el contenido lipídico de ejemplares salvajes de *H. diversicolor* que fue recolectado en distintas estaciones, siendo en invierno cuando éstos presentaron mayor proporción lipídica en peso seco. Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio indican que las diferentes temperaturas de cultivo de *H. diversicolor* producen variaciones significativas en la cantidad de ácidos grasos individuales,

pero, sin embargo, no producen alteraciones notorias en el perfil de clases lipídicas. Hay que destacar que todos los n-3 LC-PUFA, entre ellos el EPA y el DHA, presentan valores elevados en los poliquetos analizados, especialmente en los ejemplares cultivados en agua fría ($13,43 \pm 5,04$ y $10,02 \pm 3,82$ μg ácido graso/mg peso seco de poliqueto, respectivamente). Este dato refuerza e impulsa la posibilidad de incluir a *H. diversicolor* como un ingrediente de calidad para la dieta de peces de acuicultura. El EPA y el DHA son componentes principales del aceite de pescado, que la mayoría de las especies de vertebrados marinos que se cultivan son incapaces de producir al carecer de las enzimas necesarias para ello (Sargent et al., 1999; Reis et al., 2021b). Por tanto, al no poder sintetizarlo, deben ingerirlo a través de la dieta, por lo que la posibilidad de obtenerlo de poliquetos cultivados sería un paso clave para avanzar en la mejora ambiental de la actividad acuícola, así como en el mantenimiento de los beneficios que para la salud humana tiene el consumo de productos marinos. El contenido de ARA también ha sido mayor bajo condiciones de agua fría. El aumento en general del contenido de PUFA en ambientes fríos ha sido observado en otras especies marinas como la almeja americana (*Mercenaria mercenaria*).

Actualmente son poco conocidas las rutas biosintéticas y metabólicas de los PUFA en niveles tróficos intermedios entre los productores marinos primarios y los peces, que están ocupados mayormente por invertebrados. Sin embargo, cada vez parece más evidente que la síntesis *de novo* de los PUFA puede ser llevada a cabo por algunos animales inferiores (Monroig et al., 2013), lo cual concuerda con los elevados niveles de LC-PUFA obtenidos en el presente trabajo. No obstante, el perfil lipídico de los ejemplares alimentados con bagazo no fue tan rico en PUFA como el de los alimentados con pienso comercial, por lo que son necesarios más estudios para poder discernir la capacidad de la especie de estudio para biosintetizar estos ácidos grasos esenciales a partir de precursores de menor número de átomos de carbono como el linolénico (18:3n-3) o el linoleico (18:2n-6).

6. Conclusiones

1. El poliqueto *Hediste diversicolor* presenta mayor tasa de crecimiento a una temperatura media de 20,2 °C que a 11,3 °C.
2. *Hediste diversicolor* presenta la misma tasa de crecimiento (SGRT) al ser alimentado con pienso acuícola comercial que con bagazo de cerveza a una concentración cuatro veces superior a la cantidad proporcional de humedad y materia orgánica.
3. La temperatura afecta de manera más destacable a la composición en ácidos grasos de *Hediste diversicolor* que a su perfil de clases lipídicas.
4. El elevado contenido de omega-3 LC-PUFA en *Hediste diversicolor* convierte a esta especie en un potencial alimento para peces de acuicultura.
5. El contenido de omega-3 LC-PUFA en *Hediste diversicolor* es mayor cuando es cultivado en agua fría.

7. Bibliografía

- Abedi, E., y Sahari, M.A. (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Sci. Nutr.* 2(5): 443–463.
- Batista, F.M., e Costa, P.F., Matias, D., Joaquim, S., Massapina, C., Passos, A.M., Pousao, P., y da Fonseca, L.C. (2003). Preliminary results on the growth and survival of the polychaete *Nereis diversicolor* (OF Muller, 1776), when fed with faeces from the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 19(1-4): 443-446.
- Bell, M.V., y Tocher, D.R. (2009). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. In: *Lipids in aquatic ecosystems. Springer New York*, pp. 211-236.
- Bischoff, A.A., Fink, P., y Waller, U. (2009). The fatty acid composition of *Nereis diversicolor* cultured in an integrated recirculated system: possible implications for aquaculture. *Aquaculture* 296: 271–276.
- Cardinaletti, G., Mosconi, G., Salvatori, R., Lanari, D., Tomassoni, D., Carnevali, O., y Polzonetti-Magni, A.M. (2009). Effect of dietary supplements of mussel and polychaetes on spawning performance of captive sole, *Solea solea* (Linnaeus, 1758). *Anim. Reprod. Sci.* 113 (1-4): 167–176.
- Christie, W.W. (1982). *Lipid analysis*. Oxford: Pergamon Press.
- Devlin, T. M. 4ª edición. (2004). *Bioquímica*. Reverté. Madrid, España.
- Estévez, A., Padrell, L., Iñarra, B., Orive, M., y San Martín, D. (2021). Brewery by-products (yeast and spent grain) as protein sources in gilthead seabream (*Sparus aurata*) feeds. *Aquaculture* 543: 736921.
- FAO (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture: Sustainability in Action*. Rome: FAO.
- Fidalgo e Costa, P., Narciso, L., y Cancela da Fonseca, L. (2000). Growth, survival and fatty acid profile of *Nereis diversicolor* (O. F. Muller, 1776) fed on six different diets. *Bull. Mar. Sci.* 67: 337–343.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H., y Sloane, A. (1957). Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226(1): 497-509.
- García-Alonso, J., Muller, C.T., y Hardege, J.D. (2008). Influence of food regimes and seasonality on fatty acid composition in the ragworm. *Aquat. Biol.* 4: 7–13.
- Glencross, B.D. (2009). Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Rev. Aquacult.* 1(2): 71-124.
- Harrison, K.E. (1991). Crustacean reproduction nutrition. *Crustac. Nutr. News* 7: 62–70.
- Heip, C., y Herman, R. (1979). Production of *Hediste diversicolor* O. F. Müller (Polychaeta) in a shallow brackish water pond. *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 8: 297–305.
- Hixson, S.M. (2014). Fish nutrition and current issues in aquaculture: the balance in providing safe and nutritious seafood, in an environmentally sustainable manner. *J. Aquac. Res. Development* 5: 234.
- Hoppenbrouwers, T., Cvejić Hogervorst, J.H., Garssen, J., Wichers, H.J., y Willemsen, L.E. (2019). Long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) in the prevention of food allergy. *Front. Immunol.* 10, 1118.

- Jerónimo, D., Lillebø, A.I., Rey, F., Ii, H.K., Domingues, M.R.M., y Calado, R. (2021). Optimizing the timeframe to produce polychaetes (*Hediste diversicolor*) enriched with essential fatty acids under different combinations of temperature and salinity. *Front. Mar. Sci.* 8: 671545.
- Kanazawa, A. (1997). Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. *Aquaculture*, 155(1-4): 129-134.
- Kok, B., Malcorps, W., Tlustý, M.F., Eltholth, M.M., Auchterlonie, N.A., Little, D.C., Harmsen, R., Newton, R.W., Davies, S.J. (2020). Fish as feed: Using economic allocation to quantify the Fish In: Fish Out ratio of major fed aquaculture species. *Aquaculture*, 528: 735474.
- Kristensen, E. (1983). Ventilation and oxygen uptake by three species of Nereis (Annelida: Polychaeta). I. Effects of hypoxia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 12: 289-297.
- Lee, J. M., Lee, H., Kang, S., y Park, W. J. (2016). Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients*, 8(1): 23.
- Luis O.J., y Passos, A.M. (1995). Seasonal changes in lipid content and composition of the polychaete *Nereis* (*Hediste*) *diversicolor*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 111(4): 579– 586.
- Luis, O.J., y Ponte, A. (1993). Control of reproduction of the shrimp *Penaeus kerathurus* held in captivity. *J. World Aquacult. Soc.* 24(1): 31–39.
- Lund, I., Rodríguez, C., Izquierdo, M.S., El Kertaoui, N., Kestemont, P., Reis, D.B., Dominguez, D., Pérez, J.A. (2020). Influence of salinity and linoleic or α -linolenic acid based diets on ontogenetic development and metabolism of unsaturated fatty acids in pike perch larvae (*Sander lucioperca*). *Aquaculture*, 500: 550-561.
- McLusky, D.S. (1989). The estuarine ecosystem, 2nd Edn. Chapman & Hall, New York, United States.
- Monroig, Ó., Tocher, D.R. y Navarro, J.C. (2013). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: Recent advances in molecular mechanisms. *Mar. Drugs*, 11: 3998-4018.
- Monroig, Ó., y Kabeya, N. (2018). Desaturases and elongases involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic invertebrates: a comprehensive review. *Fish. Sci.* 84(6): 911-928.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Buschmann, A.H., Bush, S.R., Cao, L., Klinger, D.H., Little, D.C., Lubchenco, J., Shumway, S.E., y Troell, M. (2020). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, 591: 551-563.
- Nazzaro, J., San Martín, D., Pérez-Vendrell, A. M., Padrell, L., Iñarra, B., Orive, M., y Estévez, A. (2021). Apparent digestibility coefficients of brewer's by-products used in feeds for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 530: 735796.
- Nesto, N., Simonini, R., Prevedelli, D., y Da Ros, L. (2012). Effects of diet and density on growth, survival and gametogenesis of *Hediste diversicolor* (O.F. Müller, 1776) (Nereididae, Polychaeta). *Aquaculture* 362–363: 1–9.
- OESA (Observatorio Español de Acuicultura) (consulta realizada el 17 de agosto de 2021). <https://www.observatorio-acuicultura.es/comunicacion/actualidad/el-gran-potencial-de-los-invertebrados-marinos-para-alimentacion-y-en>

- Ofori-Mensah, S., Yildiz, M., Arslan, M., Eldem, V., y Gelibolu, S. (2020). Substitution of fish oil with camelina or chia oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) diets: Effect on growth performance, fatty acid composition, haematology and gene expression. *Aquacult. Nutr.* 26(6): 1943-1957.
- Olive, P.J.W. (1999). Polychaete aquaculture and polychaete science: a mutual synergism. *Hydrobiologia* 402: 175-183.
- Pérez, J.A., Rodríguez, C., Bolaños, A., Cejas, J.R., y Lorenzo, A. (2014). Beef tallow as an alternative to fish oil in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles: Effects on fish performance, tissue fatty acid composition, health and flesh nutritional value. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116: 571-583.
- Pombo, A., Baptista, T., Granada, L., Ferreira, S. M., Gonçalves, S. C., Anjos, C., ... y Costa, J.L. (2020). Insight into aquaculture's potential of marine annelid worms and ecological concerns: a review. *Rev. Aquac.* 12(1): 107-121.
- Reis, D.B., Shcherbakova, A., Riera, R., Martín, M.V., Domingues, P., Andrade, J.P., Jiménez-Prada, P., Rodríguez, C., Sykes, A.V. y Almansa, E. (2021a). Effects of feeding with different live preys on the lipid composition, growth and survival of *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquacult. Res.* 52: 105-116.
- Reis, D.B., Pérez, J.A., Hamre, K., Acosta, N.G., Norberg, B., Harboe, T., y Rodríguez, C., The lipid metabolism of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae determined by ¹⁴C in vivo incubations. *Aquaculture*, 540: 736733.
- Rodríguez, C., Lorenzo, A. y Martín, V. (2012). Nutrición lipídica. En Sanz F. (coord.). La nutrición y alimentación en piscicultura (pp. 151-231). Madrid: Editorial Paraninfo.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., y Tocher, D.R. (1995). Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol.* 11(3-4): 183-198.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., y Estevez, A. (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177(1): 191-199.
- Sadeghi-Nassaj, S. M., Batanero, G. L., Mazuecos, I. P., Alonso, C., y Reche, I. (2018). Sea cucumbers reduce nitrogen, bacteria and transparent exopolymer particles in *Anemonia sulcata* aquaculture tanks. *Aquacult. Res.* 49(11): 3669-3681.
- Samuel-Fitwi, B., Meyer, S., Reckmann, K., Schroeder, J.P., y Schulz, C. (2013). Aspiring for environmentally conscious aquafeed: comparative LCA of aquafeed manufacturing using different protein sources. *J. Clean. Prod.* 52: 225-233.
- San Martin, D., Orive, M., Iñarra, B., Estévez, A., Fenollosa, R., Martinez, J.M y Zufía, J. (2020). Brewers' spent yeast and grain as second-generation feedstuff for aquaculture feed. *Aquafeed: Advances in Processing & Formulation*, Vol 12 Issue 1.
- Santos, A., Granada, L., Baptista, T., Anjos, C. Simoes, T., Tecelao, C., Fidalgo e Costa, P., Lino Costa, J. y Pombo, A. (2016). Effect of three diets on the growth and fatty acid profile of the common ragworm *Hediste diversicolor* (O.F. Müller, 1776). *Aquaculture*, 465: 37-42

- Scaps, P. (2002). A review of the biology, ecology and potential use of the common ragworm *Hediste diversicolor* (OF Müller) (Annelida: Polychaeta). *Hydrobiologia*, 470(1), 203-218.
- Smith, R.I. (1977). Physiological and reproductive adaptations of *Nereis diversicolor* to life in the Baltic Sea and adjacent waters. In: Reish, D.J., Fauchald, K. (eds) Essays on polychaetous annelids in memory of Dr. Olga Hartman. The Allan Hancock Foundation, University of Southern California, Los Angeles, CA, pp. 373–391.
- Tacon, A.G., y Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture* 285(1): 146-158.
- Tocher, D.R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 11(2): 107-184.
- Tocher, D.R. (2015). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture* 449: 94-107.
- Turchini, G.M., Ng, W.K., y Tocher, D.R. (Eds.) (2010). Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds (1st Edition). CRC Press, 551 pp.
- Ueda, T. (1974). Changes in the fatty acid composition of short neck clam with reference to environmental mud temperature. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 40: 949–957.
- Ward, O.P., y Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Proc. Biochem.* 40(12): 3627-3652.
- Zar, J.H., (1999). Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, p. 619.
- Zárate, R., el Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J.A., y Rodríguez, C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clin. Transl. Med.* 6: 25.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la fábrica de cerveza Rocker Beer®, que cedió amablemente el bagazo y sin cuya participación no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros de la planta de cultivos de IEO de Santander, quienes me acogieron e integraron como una más en su equipo de trabajo.

De igual manera a todos los compañeros del departamento de fisiología animal de la Universidad de La Laguna, que me aportaron una gran cantidad de información y ayudaron especialmente con los análisis lipídicos.

A mi tutora externa Inmaculada Rasines y a mi tutor interno José Pérez, por todo su generoso tiempo, consejos, correcciones, aliento y entusiasmo.

Gracias.