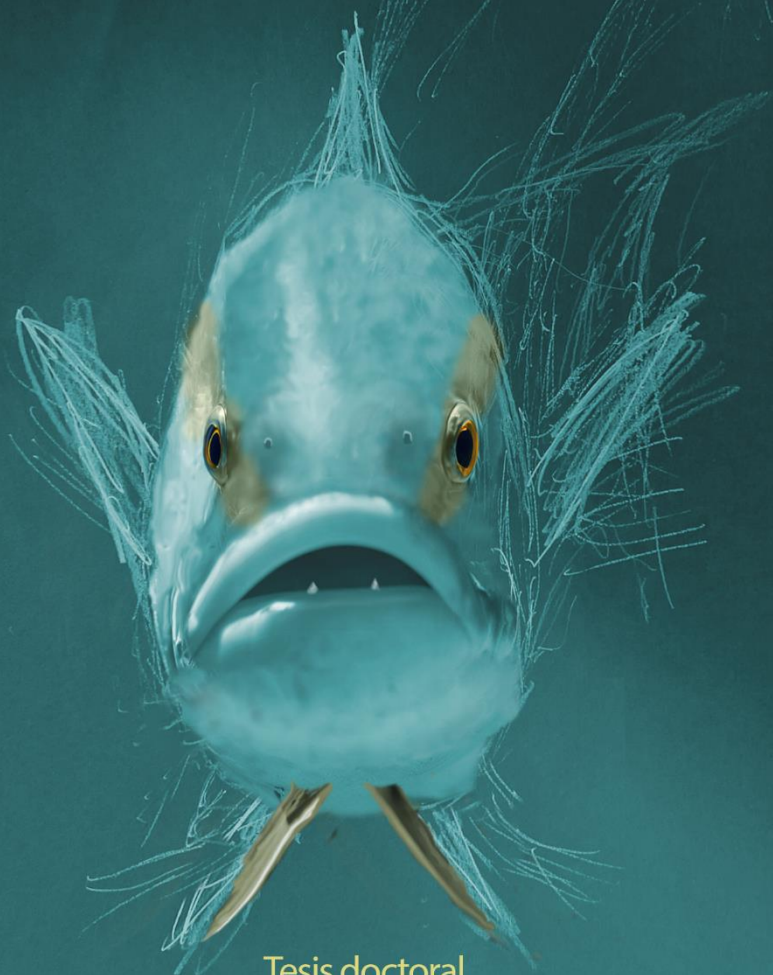




UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Salud intestinal de la *Seriola dumerili* alimentada con
ingredientes alternativos a la harina y aceite de pescado.

María Consolación Milián Sorribes



Tesis doctoral
Diciembre, 2023

Directoras:
Dra. Silvia Martínez Llorens
Dra. Ana Tomás Vidal

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA ANIMAL
GRUPO DE ACUICULTURA Y BIODIVERSIDAD



Salud intestinal de la *Seriola dumerili* alimentada con
ingredientes alternativos a la harina y aceite de pescado

Gut health of *Seriola dumerili* fed with alternative ingredients to fish
meal and fish oil.

La recompensa de nuestro trabajo no es lo que
obtenemos, sino en lo que nos convertimos.

Paulo Coelho

Agradecimientos

Durante este largo camino que es la realización de la tesis doctoral, mucha gente es la que me ha acompañado, se ha preocupado o se ha interesado por cómo iba el desarrollo, a las que tengo mucho que agradecer.

En primer lugar, me gustaría agradecer a Silvia y Ana su confianza en mí a la hora de poder realizar la tesis, en ocasiones más que la que yo podía tener en mí misma, y facilitar la realización de ésta, así como poder viajar a congresos, conocer a investigadores de otros lugares o formar parte de proyectos. Agradecer también a Miguel Jover y David Sánchez, sin los que hubiese sido imposible terminar esta tesis.

Agradecer también a Andrés, el “jefe” del LAC, apoyo indispensable en estos últimos años, el compañero de trabajo perfecto y asesor personal siempre que lo he necesitado.

Acordarme de todos los compañeros de despacho que han coincidido conmigo durante este tiempo, Víctor, Marina, Guillem, Sergio, Eslam, Leonor, Marta, Tales, Wendy y las más recientes incorporaciones en nutrición con los que este último año he compartido casi más horas que con mi familia, Rubén, Jessica, Sara, Yosu y Tatiana. Así como al resto de compañeros de laboratorio, Laura, Sandra, Luis y Javi. Y cómo no acordarme de Raquel, Javi, Nacho y Glenda (empezamos juntas y terminamos juntas) esos Merlucius que de compañeros pasaron a ser amigos y apoyo incondicional.

Tampoco me quiero olvidar de aquellos amigos que han estado y están apoyándome siempre, aunque sea en la distancia. Mis compañeros universitarios Helena, Maïté y Carrión. Mi familia geoguessa, nunca imaginé que los sentimientos traspasaran las pantallas. Mi familia valenciana, compañeros de piso y amigos, especialmente Mar, Roc, Vanessa, Carles, Laura, Maria y Berta, estar con vosotros es estar en casa. Mi K'09 siempre me acogisteis como una más.

No puedo olvidarme de mis paisanos, esos todolellanos que cuando me veían siempre preguntaban “¿Cuándo vas a terminar?”, y que tanto

me molestaba o respondía con evasivas, o “ya me invitarás cuando defiendas”.

Especialmente agradecer a mi familia, a mis tíos y primos, pero agradecimiento infinito a mis padres, sin los que esto hubiese sido imposible, a Iñaki por animarme y apoyarme cuando más lo necesitaba y a Víctor, mi hermano, amigo, referente (se puede siendo el pequeño) y que siempre estás cuando lo necesito.

Gracias, gracias y mil gracias.

RESUMEN

En la presente tesis doctoral, se llevaron a cabo diferentes ensayos con seriola mediterránea (*Seriola dumerili*) con el objetivo de evaluar la idoneidad para su producción en la acuicultura marina. Se diseñaron tres experimentos para evaluar los efectos de la sustitución dietaria de la harina de pescado (HP) y el aceite de pescado (AP) sobre la salud, así como en los parámetros zootécnicos esta especie.

En el primer trabajo se estudió la sustitución parcial y total del AP por una combinación de aceites vegetales (linaza, girasol y palma) (FO 100, FO 25 y FO 0, con sustituciones del aceite de pescado del 0%, 75% y 100%, respectivamente), así como la adición de un probiótico compuesto por *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus buchneri* en el pienso con la sustitución total del aceite de pescado (FO 0+). Se evaluaron los efectos de las distintas dietas sobre el crecimiento, parámetros nutritivos, composición de ácidos grasos (AAGG) así como la histología a nivel hepático e intestinal. El experimento se inició con peces de 175g de peso medio y la prueba tuvo una duración de 109 días. No se observaron diferencias significativas ni en el crecimiento ni en los parámetros nutritivos, que fueron muy similares en todos los tratamientos. No obstante, la sustitución de AP sí que afectó a la supervivencia siendo el grupo FO 25 el que presentó mayor supervivencia, mientras que en los peces alimentados por FO 0+ se observó mayor mortalidad. En referencia a los índices biométricos, únicamente el índice viscerosomático y el índice de la canal se vieron afectados, donde los peces alimentados con el pienso FO 0, presentaron los valores más elevados y más bajos, respectivamente. Respecto al perfil de AAGG los grupos alimentados con la dieta control (FO 100) presentaron mayor cantidad de ácido araquidónico (ARA) y ácido docosahexaenoico (DHA), mientras que los peces de las dietas con sustitución de AP tenían mayor concentración de ácido α -linoleico y un mayor ratio EPA/DHA. En cuanto a la valoración de la histología del intestino anterior (IA) únicamente se encontraron diferencias en la anchura de la capa submucosa (CSM), más estrecha en el grupo control, mientras que en el intestino posterior (IP) las diferencias se observaron en la longitud del villi (LV) más cortos los del grupo FO 25 y

en la anchura de la lámina propia (LP), más estrecha en los grupos FO 100 y FO 0+. Los resultados obtenidos mostraron que, la sustitución total de aceite de pescado no afectó negativamente a las seriolas y que la adición de *Lactobacillus* como probiótico, en general, no presentó mejoras en los parámetros analizados.

En el segundo estudio se evaluó el efecto de la alimentación de la seriola sobre el estrés oxidativo y los parámetros plasmáticos, ensayando los mismos piensos que en el estudio anterior. La sustitución de AP no afectó a la actividad de las enzimas analizadas en el hígado, IA e IP, exceptuando la actividad de la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa que tuvo mayor actividad en el hígado del grupo control y el FO 0+. En el hígado no se observaron cambios en el índice de estrés oxidativo ni en los niveles de glutatión. No obstante, sí que se encontraron diferencias en la peroxidación lipídica, presentando mayores valores el grupo FO 100 en el hígado y en el músculo rojo, así como el grupo FO 0+ que presentó los mayores valores en el intestino anterior. En los parámetros hematológicos, solo se encontraron diferencias en el colesterol siendo menor en los peces alimentados sin AP (FO 0 y FO 0+). Los resultados indicaron que la sustitución total del AP no afectó significativamente al estrés oxidativo ni a los parámetros sanguíneos analizados, así como que la inclusión del probiótico no tuvo efectos positivos sobre el estrés oxidativo y los parámetros hematológicos.

En el tercer trabajo, se estudió el efecto de la sustitución de la harina de pescado y del aceite de pescado, para lo cual se ensayaron seis dietas, una dieta control (C) con HP y AP, tres dietas con sustitución de HP (33%, 66% y 100%, llamadas FM66, FM33 y FM100 respectivamente) y dos con sustitución de AP (50% y 100%; FO50 y FO0 respectivamente). Únicamente se hallaron diferencias significativas en la supervivencia, donde la sustitución total de la HP afectó negativamente, con diferencias respecto a los otros tratamientos. A nivel histológico, la sustitución completa de la harina de pescado provocó un ensanchamiento de la lámina propia y un estrechamiento de la capa muscular en el intestino posterior, así como una disminución del diámetro de los hepatocitos. La sustitución completa del AP provocó un aumento del espesor de la lámina propia en el intestino

anterior y posterior. Respecto a la microbiota intestinal, se analizaron los grupos con la máxima sustitución de HP y AP que no hubiesen afectado al crecimiento y supervivencia, es decir, el pienso control junto con el FM33 y el FO0, encontrándose diferencias significativas en la diversidad alfa entre los grupos FM33 y FO0, siendo el grupo FO0 el que mayor diversidad y riqueza, teniendo en cuenta los índices de aspectos observados, chao1 y Shannon. Respecto a la diversidad beta, se observó una separación entre los grupos FO0 y FM33. Los resultados obtenidos indican que es posible una sustitución completa del AP sin afectar a los animales, pero la sustitución total de la harina de pescado no obtuvo buenos resultados en la supervivencia y presentó mayores efectos en el hígado e intestino.

Analizando los resultados obtenidos en los tres estudios de la presente tesis, se pueden concluir que la sustitución completa del AP es posible sin afectar negativamente a los peces desde el punto de vista del crecimiento, parámetros nutritivos, estrés oxidativo y parámetros sanguíneos, mientras que la sustitución de la HP sin provocar efectos notables en la supervivencia y alteraciones a nivel histológico en intestino e hígado solo es posible cuando se sustituye hasta el 66%.

RESUM

En aquesta tesi doctoral es van realitzar diversos experiments amb seriola mediterrània (*Seriola dumerili*) amb l'objectiu d'avaluar la idoneïtat per a la seua producció en aquicultura marina. Es van dissenyar tres experiments amb l'objectiu d'avaluar els efectes de la substitució dietètica de la farina de peix (FP) i l'oli de peix (OP) sobre la salut, així com en els paràmetres zootècnics d'aquesta espècie.

En el primer treball es va estudiar la substitució parcial i total de l'OP per una combinació d'olis vegetals (llinassa, gira-sol i palmell) (FO 100, FO 25 i FO 0, amb substitucions de l'oli de peix del 0%, 75% i 100%, respectivament), així com l'addició d'un probiòtic compost per *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus buchneri* al pinso amb la substitució total de l'oli de peix (FO 0+). Es van avaluar els efectes de les diferents dietes sobre el creixement, paràmetres nutritius, composició d'àcids grassos (AAGG) així com la histologia a nivell hepàtic i intestinal. L'experiment es va iniciar amb peixos de 175g de pes mitjà i la prova va tenir una durada de 109 dies. No es van observar diferències significatives ni en el creixement ni en els paràmetres nutritius, que van ser molt similars en tots els tractaments. No obstant això, la substitució d'OP sí que va afectar la supervivència essent el grup FO 25 el que va presentar una major supervivència, mentre que en els peixos alimentats per FO 0+ es va observar una major mortalitat. En referència als índexs biomètrics, únicament l'índex viscerosomàtic i l'índex de la canal es van veure afectats, on els peixos alimentats amb el pinso FO 0, van presentar els valors més elevats i més baixos, respectivament. Pel que fa al perfil d'AAGG els grups alimentats amb la dieta control (FO 100) van presentar una major quantitat d'àcid araquidònic (ARA) i àcid docosahexaenoic (DHA), mentre que els peixos de les dietes amb substitució d'OP tenien una major concentració d'àcid α -linoleic i una major ràtio EPA/DHA. Quant a la valoració de la histologia de l'intestí anterior (IA) únicament es van trobar diferències en l'amplada de la capa submucosa (CSM), més estreta en el grup control, mentre que en l'intestí posterior (IP) les diferències es van observar en la longitud dels vil·lus (LV) més curts els del grup FO 25 i en l'amplada de la làmina pròpia (LP), més estreta en els grups FO 100 i FO 0+. Els resultats

obtinguts van mostrar que, la substitució total d'oli de peix no va afectar negativament a les serioles i que l'addició de *Lactobacillus* com a probiòtic, en general, no va presentar millores en els paràmetres analitzats.

En el segon estudi es va avaluar l'efecte de l'alimentació de la seriola sobre l'estrès oxidatiu i els paràmetres plasmàtics, assajant els mateixos pinsos que en l'estudi anterior. La substitució d'OP no va afectar l'activitat de les enzims analitzades en el fetge, IA i IP, llevat de l'activitat de la glucosa-6-fosfat dehidrogenasa que va tenir una major activitat en el fetge del grup control i el FO 0+. En el fetge no es van observar canvis en l'índex d'estrès oxidatiu ni en els nivells de glutatió. No obstant això, sí que es van trobar diferències en la peroxidació lipídica, presentant majors valors el grup FO 100 en el fetge i en el múscul vermell, així com el grup FO 0+ que va presentar els majors valors en l'intestí anterior. En els paràmetres hematològics, només es van trobar diferències en el colesterol sent menor en els peixos alimentats sense OP (FO 0 i FO 0+). Els resultats van indicar que la substitució total de l'OP no va afectar significativament l'estrès oxidatiu ni els paràmetres sanguinis analitzats, així com que la inclusió del probiòtic no va tenir efectes positius sobre l'estrès oxidatiu i els paràmetres hematològics.

En el tercer treball, es va estudiar l'efecte de la substitució de la farina de peix i de l'oli de peix, per això es van assajar sis dietes, una dieta control (C) amb FP i OP, tres dietes amb substitució de HP (33%, 66% i 100%, anomenades FM66, FM33 i FM100 respectivament) i dues amb substitució d'OP (50% i 100%; FO50 i FO0 respectivament). Només es van trobar diferències significatives en la supervivència, on la substitució total de la FP va afectar negativament, amb diferències respecte als altres tractaments. A nivell histològic, la substitució completa de la farina de peix va provocar un engruiximent de la làmina pròpia i un estrenyiment de la capa muscular a l'intestí posterior, així com una disminució del diàmetre dels hepatòcits. La substitució completa de l'OP va provocar un augment del gruix de la làmina pròpia a l'intestí anterior i posterior. Respecte a la microbiota intestinal es van analitzar els grups amb la màxima substitució de FP i OP que no haguessin afectat el creixement i la supervivència, és a dir, el pinso

control juntament amb el FM33 i el FO0, trobant-se diferències significatives en la diversitat alfa entre els grups FM33 i FO0, essent el grup FO0 el que major diversitat i riquesa, tenint en compte els índexs d'aspectes observats, chao1 i Shannon. Respecte a la diversitat beta, es va observar una separació entre els grups FO0 i FM33. Els resultats obtinguts indiquen que és possible una substitució completa de l'OP sense afectar els animals, però la substitució total de la farina de peix no va obtenir bons resultats en la supervivència i va presentar majors efectes en el fetge i intestí.

Analitzant els resultats obtinguts en els tres estudis de la present tesi, es pot concloure que la substitució completa de l'OP és possible sense afectar negativament als peixos des del punt de vista del creixement, paràmetres nutritius, estrès oxidatiu i paràmetres sanguinis, mentre que la substitució de la FP sense provocar efectes notables en la supervivència i alteracions a nivell histològic a l'intestí i fetge només és possible quan es substitueix fins al 66%.

ABSTRACT

In this doctoral thesis, various experiments were conducted with Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerili*) with the aim of evaluating its suitability for marine aquaculture production. Three experiments were designed to assess the effects of dietary replacement of fish meal (FM) and fish oil (FO) on the health and zootechnical parameters of this species.

In the first study, partial and total replacement of FO with a combination of vegetable oils (linseed, sunflower, and palm) (FO 100, FO 25, and FO 0, with FO substitutions of 0%, 75%, and 100%, respectively) was examined, along with the addition of a probiotic composed of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri* in the feed with total replacement of fish oil (FO 0+). The effects of different diets on growth, nutritional parameters, fatty acid composition (FA), as well as hepatic and intestinal histology were evaluated. The experiment began with fish weighing 175g on average and lasted for 109 days. No significant differences were observed in either growth or nutritional parameters, which were very similar in all treatments. However, the substitution of FO did affect survival, with the FO 25 group exhibiting higher survival, while higher mortality was observed in fish fed FO 0+. Biometric indices were affected only in the viscerosomatic index and carcass index, where fish fed FO 0 had the highest and lowest values, respectively. Regarding the FA profile, the groups fed the control diet (FO 100) had higher levels of arachidonic acid (ARA) and docosahexaenoic acid (DHA), while fish in diets with FO substitution had a higher concentration of alpha-linoleic acid and a higher EPA/DHA ratio. In terms of intestinal histology, differences were found in the width of the submucosal layer in the anterior intestine (AI), which was narrower in the control group. In the posterior intestine (PI), differences were observed in villus length (VL), which was shorter in the FO 25 group, and in the width of the lamina propria (LP), which was narrower in the FO 100 and FO 0+ groups. The results obtained showed that complete replacement of fish oil did not have a negative impact on yellowtail, and the addition of *Lactobacillus* as a probiotic did not, in general, lead to improvements in the analyzed parameters.

The second study evaluated the effect of yellowtail feeding on oxidative stress and plasma parameters was evaluated using the same feeds as in the previous study. The substitution of FO did not affect the activity of the enzymes analyzed in the liver, AI, and PI, except for the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase, which had higher activity in the liver of the control group and FO 0+. No changes were observed in the oxidative stress index or glutathione levels in the liver. However, differences were found in lipid peroxidation, with the FO 100 group showing higher values in the liver and red muscle, and the FO 0+ group having the highest values in the anterior intestine. In hematological parameters, differences were only found in cholesterol levels, which were lower in fish fed without FO (FO 0 and FO 0+). The results indicated that complete substitution of FO did not significantly affect oxidative stress or the analyzed blood parameters, and the inclusion of the probiotic had no positive effects on oxidative stress and hematological parameters.

In the third study, the effect of fish meal and fish oil substitution was examined using six diets: a control diet (C) with FM and FO, three diets with FM substitution (33%, 66%, and 100%, named FM66, FM33, and FM100, respectively), and two with FO substitution (50% and 100%; FO50 and FO0, respectively). Significant differences were only found in survival, with complete FM substitution negatively affecting survival compared to the other treatments. At the histological level, the complete substitution of fish meal led to a thickening of the lamina propria and a narrowing of the muscular layer in the posterior intestine, as well as a decrease in hepatocyte diameter. Complete FO substitution led to an increase in the thickness of the lamina propria in the anterior and posterior intestines. Regarding intestinal microbiota, the groups with the highest fish meal and fish oil substitutions that did not affect growth and survival were analyzed. This included the control feed along with FM33 and FO0. Significant differences in alpha diversity were found between the FM33 and FO0 groups, with the FO0 group having higher diversity and richness, based on observed indexes, chao1, and Shannon. In terms of beta diversity, a separation was observed between the FO0 and FM33 groups. The results indicate that complete FO substitution is possible without negatively affecting the animals, but complete fish meal substitution did not yield good results in terms of survival and had more pronounced effects on the liver and intestine.

Analyzing the results obtained in the three studies of this thesis, it can be concluded that complete FO substitution is possible without negatively affecting the fish in terms of growth, nutritional parameters, oxidative stress, and blood parameters, while FM substitution without notable effects on survival and histological alterations in the intestine and liver is only possible when substituting up to 66%.

Índice de contenidos

Índice de tablas	IV
Índice de figuras	VI
Índice de abreviaturas	VIII
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. Estado actual de la acuicultura.....	3
2. Retos de la acuicultura mediterránea	4
3. Aspectos biológicos de la <i>Seriola dumerili</i>	8
4. Situación actual de la <i>Seriola dumerili</i> en acuicultura.....	10
5. La nutrición de la <i>Seriola dumerili</i>	11
5.1. Potenciales ingredientes alternativos	12
6. Efecto en la salud intestinal de la utilización de ingredientes alternativos en peces	20
7. Adición de probióticos en los piensos	22
Capítulo 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	25
Capítulo 3. RESUMEN DE EXPERIMENTOS	31
Capítulo 4. Efecto de la sustitución de Aceite de pescado y adición de probióticos en el crecimiento, composición corporal y parámetros histológicos en la seriola mediterránea (<i>Seriola dumerili</i>)	37
1. SPECIFIC OBJECTIVES	39
2. MATERIAL AND METHODS	39
2.1. Fish and experimental diets	39
2.2. Biometric parameters, growth indices and proximate composition.....	40
2.3. Chemical analysis	41
2.4. Histological analysis.....	42
2.5. Statistical analysis.....	42
2.6. Ethical statement.....	43
3. RESULTS	43

3.1.	Composition of diets	43
3.2.	Growth, nutritional and biometric parameters.....	44
3.3.	Body composition.....	46
3.4.	Histological observations.....	49
4.	DISCUSSION	51
Capítulo 5. Estado oxidativo hepático, muscular e intestinal y parámetros plasmáticos de la seriola mediterránea (<i>Seriola dumerili</i>, Risso, 1810) alimentada con dietas con sustitución de aceite de pescado y adición de probióticos.....		
1.	SPECIFIC OBJECTIVES	61
2.	MATERIALS AND METHODS.....	61
2.1.	Fish and experimental diets	61
2.2.	Diets chemical analysis.....	62
2.3.	Enzymes activity and lipid peroxidation determination in muscle, liver and fish intestine.....	63
2.4.	Glutathione and oxidative stress index in liver	64
2.5.	Blood parameters	65
2.6.	Statistical análisis.....	65
3.	RESULTS	66
3.1.	Fish and experimental diets	66
3.2.	Blood parameters	68
4.	DISCUSSION	68
Capítulo 6. Alternativas a la harina de pescado y aceite de pescado, alteraciones en la salud de la seriola mediterránea (<i>Seriola dumerili</i>).....		
1.	SPECIFIC OBJECTIVES	77
2.	MATERIALS AND METHODS.....	77
2.1.	Fish and experimental diets	77
2.2.	Chemical analysis	79

2.3.	Histological analysis.....	79
2.4.	16S rRNA sequencing and library construction	80
2.5.	Bioinformatics analysis	81
2.6.	Statistical analysis.....	82
3.	RESULTS	82
3.1.	Growth data.....	82
3.2.	Histological analysis.....	83
3.3.	Gut microbiota	87
4.	DISCUSSION	92
Capítulo 7. DISCUSIÓN GENERAL		99
1.	Sustitución de AP.....	101
2.	Sustitución de HP	107
3.	Utilización de probióticos.....	110
4.	Producción de <i>Seriola dumerili</i> . Vistas al futuro	112
Capítulo 8. CONCLUSIONES		117
Capítulo 9. REFERENCIAS GENERALES		123

Índice de tablas

Tabla 1.1 Producción mundial de la pesca y la acuicultura (millones de toneladas) ^a (FAO, 2022).....	4
Tabla 1.2 Comparación de DHA, EPA, TGC y supervivencia en estudios con sustitución de HP y AP en <i>Seriola</i> sp.	17
Table 4.1. Feed Ingredients and proximate composition of the experimental diets.....	40
Table 4.2 Fatty profile (g 100/g, wet matter) of experimental diets..	43
Table 4.3 Effect of dietary fish oil replacement on growth performance, survival and nutrient utilization of <i>S. dumerili</i> after 109 days of feeding.	44
Table 4.4 Biometric indices of <i>S. dumerili</i> after 109 of feeding the experimental diets.....	45
Table 4.5 Initial and final proximal composition (g 100/g, wet weight), crude energy content (MJ/kg) and productive values in <i>S. dumerili</i> fed with the different experimental diets, after 109 days of feeding the experimental diets.....	46
Table 4.6 Composition of fatty acids (g 100/g, wet weight) of the whole body of <i>S. dumerili</i> fed with experimental diets for 109 days.....	47
Table 4.7 Fatty acids productive values (FAPV) (% by wet weight) in <i>S. dumerili</i> fed with experimental diets for 109 days.....	48
Table 4.8 Histological measurements of the anterior intestine in yellowtail fed the experimental diets for 109 days.	49
Table 4.9 Histological measurements of the posterior intestine in fish fed the experimental diets for 109 days.....	50
Table 5.1 Formulation (g kg ⁻¹) of the experimental diets. Feed ingredients and proximate composition.	61
Table 5.2 Antioxidant enzyme activities ¹ in liver, foregut, and hindgut of Mediterranean yellowtail (<i>Seriola dumerili</i>) fed the experimental diets for 109 days.	66
Table 5.3 Total glutathione (tGSH), reduced glutathione (GSH), oxidised glutathione (GSSG) and oxidative stress index (OSI) in liver of	

Mediterranean yellowtail (<i>Seriola dumerili</i>) fed the experimental diets for 109 days.....	67
Table 5.4 Lipid peroxidation levels (nmols MDA g ⁻¹ tissue) in liver, foregut, hindgut, white muscle and red muscle of Mediterranean yellowtail (<i>Seriola dumerili</i>) fed the experimental diets for 109 days.	67
Table 5.5 Hematological parameters of Mediterranean yellowtail (<i>Seriola dumerili</i>) fed the experimental diets for 109 days.	68
Table 6.1 Formulation and proximate composition of the experimental diets.	78
Table 6.2 Histological measurements of the anterior and posterior intestine in fish fed the experimental diets (FM replacement) at the end of the growth trial.	83
Table 6.3 Histological measurements of liver in fish fed the experimental diets (FM replacement) at the end of the growth trial.	85
Table 6.4 Histological measurements of the anterior and posterior intestine in fish fed the experimental diets (FO replacement) at the end of the growth trial.	85
Table 6.5 Histological measurements of the liver in fish fed the experimental diets (FO replacement) at the end of the growth trial.	87

Índice de figuras

Figura 1.1 Producción mundial de la pesca y la acuicultura (FAO, 2022).	3
Figura 1.2 Producción de las principales especies marinas de acuicultura en toneladas en España en el periodo 1975-2021 (APROMAR, 2022).	5
Figura 1.3 Evolución de la producción de la <i>Seriola dumerili</i> en el Mediterráneo.	7
Figura 1.4 Ejemplar de seriola mediterránea (<i>Seriola dumerili</i>).	9
Figura 1.5 Distribución global de la seriola mediterránea (<i>Seriola dumerili</i>). Fuente: www.fishbase.org	9
Figura 3.1 Resumen de los experimentos realizados durante esta tesis doctoral. Elaboración propia.	33
Figure 4.1 Microphotographs of liver section (a) FO 100 (20x). b) FO 25 (20x). c) FO 0+ (20x). d) FO 0 (20x)) of yellowtail. Hematoxylin and eosine staining.	51
Figura 6.1 Mean weight evolution of fish per treatment along the growth trial.....	82
Figura 6.2 Survival per treatment during through the growth trial. Asterisk indicates significant differences between treatments ($p<0.05$).	83
Figure 6.3 Microphotographs of posterior intestine section (a) C (20x). (b) FM66 (20x). (c) FM33 (20x). (d) FM0 (20x) of yellowtail. Haematoxylin and eosine staining.	84
Figure 6.4 Microphotographs of posterior intestine section (a) C (20x) (b) FO50 (20x) (c) FO0 (20x) of yellowtail. Haematoxylin and eosine staining.	85
Figure 6.5 Microphotographs of liver section (a) C (20x). (b) FM66 (20x). (c) FM33 (20x). (d) FM0 (20x) of yellowtail. Haematoxylin and eosine staining.	86
Figure 6.6 Microphotographs of liver section (a) C (20x) (b) FO50 (20x) (c) FO0 (20x) of yellowtail. Haematoxylin and eosine staining.....	87

Figura 6.7 16S OUT Relative abundance (%) of the main taxa at the phylum level present in control diet (C), the FM substitute diet (FM33) and FO replacement (FO0).	88
Figure 6.8 Venn diagrams at genus taxonomic level. OTUs included were present in percentages above 1%. Common bacterial genus are displayed in the middle regions and specific bacterial families of fish fed the C, FM33 and the FO0 diet are displayed in blue, orange and red colour.	89
Figure 6.9 α -Diversity measures; (A) Observed features, (B) Shannon index and (C) Chao1 index, of 16S microbiota gut community compositions of experimental groups control diet (C), the FM substitute diet (FM33) and FO replacement (FO0).	91
Figure 6.10 PCoA Unweighted Unifrac distance of the microbiota of experimental groups control diet (C), the FM substitute diet (FM33) and FO replacement (FO0). The first, second and third principal component explained 46% of the sample variations.	92
Figura 7.1 Esquema de los análisis realizados durante la tesis doctoral. En color azul aquellos análisis que han detectado diferencias entre dietas y en color verde aquellos que no detectaron diferencias.	101
Figura 7.2 Esquema de los niveles máximos de sustitución del AP en piensos para <i>Seriola dumerili</i> sin que tenga efecto sobre los distintos aspectos analizados.	106
Figura 7.3 Esquema de los niveles máximos de sustitución de la HP en piensos para <i>Seriola dumerili</i> sin que tenga efecto sobre los distintos aspectos analizados.	109

Índice de abreviaturas

Castellano

AAE: Aminoácidos esenciales
ARA: Ácido araquidónico
AP: Aceite de pescado
CSM: Capa submucosa
CTC: Coeficiente térmico de crecimiento
DHA: Ácido docohexanoico
EPA: Ácido eicosapentanoico
FC: Factor de condición
GB: Grasa bruta
HP: Harina de pescado
HUFA: Ácidos grasos de cadena larga o altamente insaturados
IA: Intestino anterior
ICA: Índice de conversión del alimento
IHS: Índice hepatosomático
IM: Índice muscular
IP: Intestino posterior
IVS: Índice viscerosomático
LV: Longitud del villi
LP: Lámina propia
MS: Materia seca
PB: Proteína bruta
PC: Porcentaje de canal
TAD: Tasa de alimentación diaria
TCI: Tasa de crecimiento instantáneo

English

ARA: Arachidonic acid
BTH: Butylated hydroxytoluene
CAT: Catalase
CF: Condition factor
CP: Crude protein
CrF: Crude Fat
CS: Chemical score
DHA: Docosahexaenoic acid
DP: Dressout Percentage

DTNB: Dithiobis nitrobenzoic acid
EDTA:
EPA: Eicosapentaenoic acid
EPV: Energy protein value
FCR: Feed conversion ratio
FI: Feed intake
FM: Fish meal
FO: Fish oil
FPV: Fat protein value
G6PD: Glucosa-6-phosphate dehydrogenase
GPX: Glutathione peroxidase activity
GR: Glutathione reductase activity
GSH: Reduced glutathione
GSSG: oxidized glutathione
HSI: Hepatosomatic index
HUFA: Highly unsaturated fatty acids
IA: Index of atherogenicity
LC-HUFA: Long chain high unsaturated fatty acids
LC-PUFA: Long chain poly unsaturated fatty acids
LDH: Lactate dehydrogenase
NADP: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen
MDA: Malondialdehyde
MFI: Mesenteric fat index
MI: Muscle index
ML: Muscular length
MUFA: Mono-unsaturated fatty acids
OSI: Oxidative stress index
PL: Phospholipids
PPV: Protein productive value
PUFA: Poly unsaturated fatty acids
RBC: Red blood cell
SGR: Specific growth rate
SL: Serosa length
SML: Submucosa length
SOD: Superoxide dismutase
TCA: Thio barbituric acid
tGSH: Total glutathione
VO: Vegetable oil
VL: Villus length

VSI: Viscerosomatic index

WI: weight increase

WLP: Width of lamina propria

WVL: Width villi

Capítulo 1:

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Estado actual de la acuicultura

Según la FAO, la acuicultura es la producción de organismos acuáticos (peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas) que en un futuro será la única posibilidad de mantener la proporción actual de pescado en la dieta humana.

La producción mundial de pescado para el consumo humano ha aumentado por encima del crecimiento de la población en los últimos 50 años. El consumo de pescado per cápita se ha incrementado de forma notoria, pasando de los 16,1 kg en 2001 a 20,2 kg en 2020 y con previsión de seguir aumentando (FAO, 2022). Además, como se puede ver en la Figura 1.1 la cantidad de pescado extraído de los caladeros de pesca se ha estabilizado alrededor de los 90-100 millones de toneladas anuales desde los años 90, por lo que se tienen que buscar otras alternativas para la obtención de mayor cantidad de pescado sin comprometer a los recursos naturales y ahí es donde la acuicultura desempeña un papel fundamental.

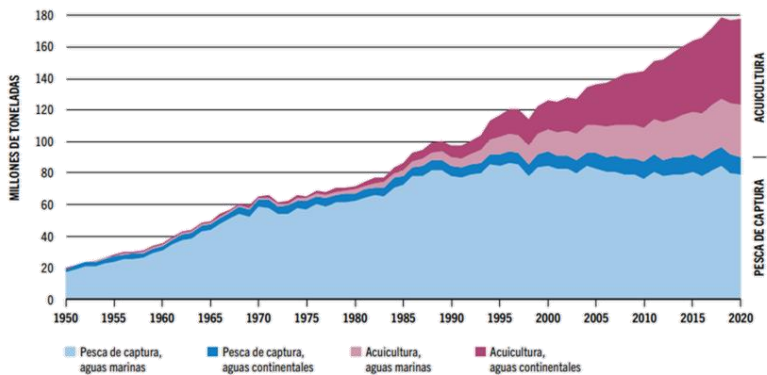


Figura 1.1 Producción mundial de la pesca y la acuicultura (FAO, 2022).

La producción acuícola mundial se ha incrementado significativamente en los últimos años, desde el inicio de siglo hasta la actualidad casi se ha triplicado, pasando de unos 33 millones de toneladas en el año 2000 a los más de 90 en el año 2020. Pero este incremento no se ha producido en todas partes por igual, sino que destaca el aumento de la acuicultura continental en la zona asiática, especialmente en China.

Si analizamos los datos más actuales proporcionados por la FAO, la producción anual de pescado ha sido de casi 178 millones de toneladas (Tabla 1.1), siendo de acuicultura un 49%, el porcentaje más elevado de la producción acuícola desde que se tiene registros. La mayor parte de la producción mundial de pescado, un 88 % (157 millones de toneladas) va destinada al consumo humano, porcentaje que se mantiene estable en la última década. Cabe destacar que aproximadamente la mitad del pescado que consume la población es fresco o refrigerado. El pescado que no está consumido por la población de forma directa, unos 20 millones de toneladas, principalmente va destinado a la fabricación de aceites y harinas de pescado.

Tabla 1.1 Producción mundial de la pesca y la acuicultura (millones de toneladas)^a (FAO, 2022).

	2012	2014	2016	2018	2019	2020
Producción						
<u>Pesca captura</u>						
Continental	11,2	11,3	11,6	12,0	12,1	11,5
Marina	78,4	79,9	79,3	84,5	80,1	78,8
Pesca de captura total	89,6	91,2	90,9	96,5	92,2	90,3
<u>Acuicultura</u>						
Continental	42,0	46,9	51,4	51,6	53,3	54,4
Marina	24,4	26,8	28,7	30,9	31,9	33,1
Acuicultura total	66,4	73,7	80,0	82,5	85,2	87,5
Total a nivel mundial	156,0	164,9	170,9	178,9	177,4	177,8
Utilización						
Consumo humano	136,4	144,8	151,2	156,8	158,1	157,4
Uso no alimentario	19,6	20,0	19,7	22,2	19,3	20,4
Población (miles de millones)	7,1	7,3	7,4	7,6	7,7	7,8
Consumo <i>per capita</i> (kg)	19,2	19,9	20,3	20,5	20,5	20,2

^aexcluidos los mamíferos acuáticos, cocodrilos, lagartos y caimanes, las algas y otras plantas acuáticas.

2. Retos de la acuicultura mediterránea

La acuicultura, o cría de organismos acuáticos en ambientes controlados, sigue siendo una industria en crecimiento en la actualidad. Se ha observado un crecimiento significativo en las últimas

décadas y se espera que esta tendencia continúe debido a la creciente demanda global de productos del mar. Pero en España la acuicultura se ha desarrollado en un número limitado de especies, estando la marina principalmente representada por la producción de dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), rodaballo (*Scophthalmus maxima*), corvina (*Argyrosomus regius*) y lenguado (*Solea senegalensis*) (Figura 1.2). Esta producción acuícola aumentó considerablemente hasta el 2009 y desde entonces ha estado más o menos estancada o decadente hasta el 2015 que se incrementó la producción hasta superar el máximo de la serie histórica en 2019, pero en 2020 se produjo un notable descenso, posiblemente ocasionado por la pandemia debida al COVID-19 y sus restricciones, parece ser que en el año 2021 se ha incrementado, aunque no está claro si este aumento es únicamente para compensar las pérdidas de producción en el año 2020 o aprovechando la tendencia se prolongará en el tiempo y se rebasará el máximo histórico de toneladas producidas.

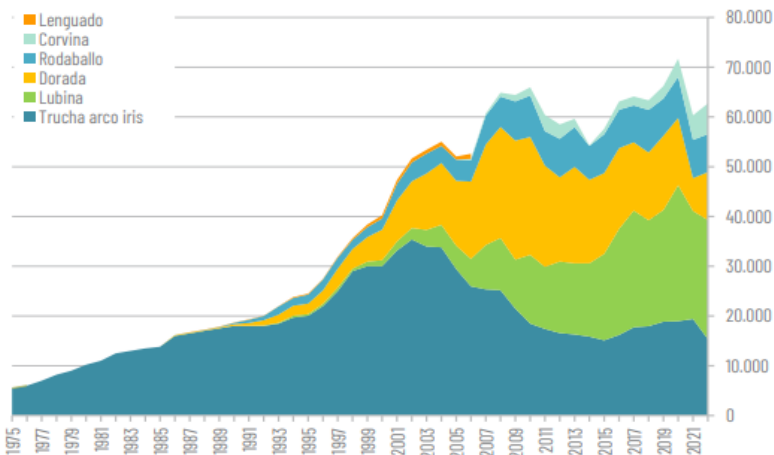


Figura 1.2 Producción de las principales especies marinas de acuicultura en toneladas en España en el periodo 1975-2021 (APROMAR, 2022).

En España el consumo de productos acuáticos ha disminuido en los últimos años, tanto en cantidad como en valor del producto, incluso con el aumento de precios (un 4,3% más elevados) (APROMAR, 2022), siendo los más consumidos merluza, sardina, salmón, lenguado,

bacalao y atún. Esta reducción del consumo principalmente se ha notado en el pescado fresco y congelado con un descenso de alrededor de un 10%. Un posible aumento de la oferta podría aumentar el consumo y atenuar la importante bajada del consumo.

Desde el año 2020, con los inconvenientes relacionados con la pandemia ocasionada por el COVID-19 y los daños materiales en instalaciones de acuicultura causadas por distintas borrascas en el Mediterráneo, el futuro empresarial fue incierto y cuando parecía que se estaba en una recuperación post-covid. Hoy en día, se ha vuelto a una incertidumbre con la invasión rusa de Ucrania. Uno de los impactos más importantes ha sido un aumento del coste de las materias, por lo que se ve amenazada la viabilidad de la acuicultura, ya que el precio de elementos imprescindibles en la acuicultura como son el pienso y el oxígeno han aumentado en un 50% y 30% respectivamente, así como el coste de la energía.

La acuicultura en España tiene diversas oportunidades para mejorar su rentabilidad y ser más eficiente. Algunas de las claves podrían ser, la implementación de tecnologías innovadoras, el uso de sistemas de recirculación de agua más eficientes, tecnologías de monitoreo automatizado y sistemas de alimentación avanzados pueden reducir los costos de producción y mejorar la eficiencia operativa. La búsqueda de alternativas sostenibles para la alimentación puede ayudar a reducir los costos; implementar prácticas adecuadas de gestión sanitaria, programas de vacunación y protocolos de bioseguridad puede ayudar a prevenir enfermedades y reducir la mortalidad; la apertura de nuevos mercados, tanto a nivel nacional como internacional, es otra clave para aumentar la rentabilidad de la acuicultura española o la diversificación de especies cultivadas. Además de las especies tradicionales como el mejillón, la lubina y la dorada, existe la posibilidad de criar especies menos comunes, pero con demanda en el mercado, lo que abriría nuevas oportunidades comerciales y aumentaría los ingresos.

Una de las posibles especies para la diversificación del mercado con mejores características es la seriola mediterránea (*Seriola dumerili*), ya que tiene un crecimiento muy rápido, siendo 10 veces superior en el

caso de la lubina, superando el kilo en un año (de la Gándara, 2006) incluso puede llegar a casi 3 kg en un año (Asche & Bjørndal, 2011). La temperatura óptima para su crecimiento está entre 20 y 24 °C, siendo temperaturas inferiores a los 9 °C mortales, condiciones que se acoplan a las del mar mediterráneo.

Además, que tiene unas características que se adaptan a la producción acuícola mediterránea, su carne tiene una excelente calidad y presenta un alto valor comercial (de entre 10-20 €/kg en el mercado mediterráneo y que ha alcanzado hasta los 30 €/kg en Japón) (Abellán-Martínez & Arnal, 2013) así como en otras partes de mundo donde también es altamente apreciada (Nakada, 2000). La *Seriola dumerili* se ha convertido en un producto popular en los mercados de pescados debido a su sabor delicado y su versatilidad culinaria. Su carne de alta calidad y textura firme la hacen atractiva tanto para el consumo fresco como para su procesamiento en productos como filetes, sushi y sashimi. La producción del pez limón en el mediterráneo en el 2021 ha aumentado un 240% respecto al año 2020 (Figura 1.3) liderada por la producción de Grecia y España.

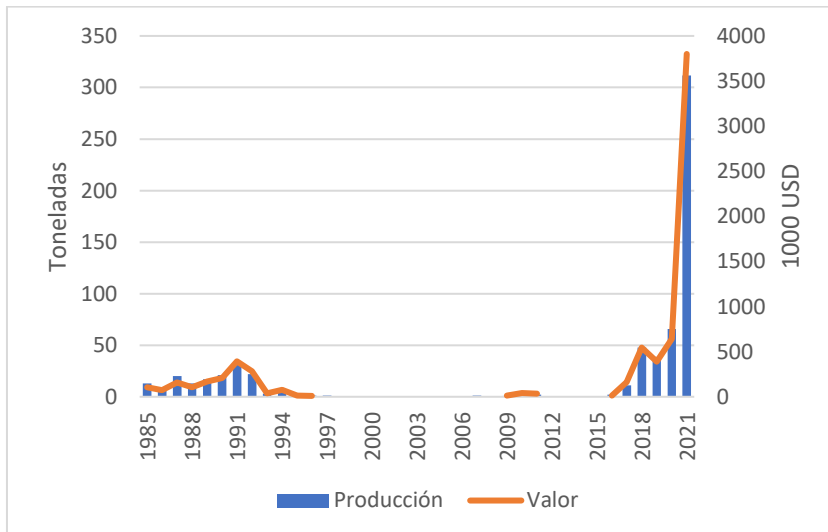


Figura 1.3 Evolución de la producción de la *Seriola dumerili* en el Mediterráneo.

Si comparamos la seriola mediterránea con otras especies de su género con un mercado establecido, es muy parecida a la *Seriola quinqueradiata* que en Japón ha experimentado un crecimiento significativo y ha alcanzado más de 140 mil toneladas al año y es muy valorada en la gastronomía. Por lo que es factible el incremento del consumo de la seriola mediterránea.

3. Aspectos biológicos de la *Seriola dumerili*

La *Seriola dumerili*, comúnmente conocida como pez limón o lecha, es una especie de pez teleósteo marino perteneciente a la familia *Carangidae*. Nativa del mar Mediterráneo y es considerada la especie de mayores dimensiones del género *Seriola* (Poortenaar et al., 2001).

La seriola mediterránea (Figura 1.4) posee un cuerpo alargado, de altura moderada y algo comprimido, los ojos son relativamente pequeños. La boca es relativamente grande con dientes pequeños en las mandíbulas colocados en varias filas lo que le permite alimentarse de una amplia variedad de presas, incluyendo peces, calamares y crustáceos. La aleta pectoral y la pélvica tienen un tamaño similar. Su dorso es de color azul verdoso brillante, mientras que los flancos y el vientre son de un tono plateado. Además, presenta una franja amarilla característica que se extiende desde la parte posterior del ojo hasta la aleta caudal, de ahí su nombre común. Los ejemplares juveniles suelen tener manchas oscuras en el cuerpo, que desaparecen a medida que crecen. Esta especie puede alcanzar tamaños considerablemente grandes. Los ejemplares adultos pueden medir hasta 1,9 metros de longitud y pesar alrededor de 80 kilogramos, aunque normalmente suele estar alrededor de los 18 kg. Las hembras crecen más en tamaño y viven más que los machos.



Figura 1.4 Ejemplar de seriola mediterránea (*Seriola dumerili*).

Es una especie que se encuentra en las regiones subtropicales a lo largo de todo el mundo (Figura 1.5). Es un pez tanto epibentónico como pelágico, es decir, vive tanto en la superficie del fondo marino como en la columna de agua. Puede aparecer hasta los 360 metros de profundidad. Los juveniles viajan en grupos pequeños, mientras que cuando son adultos lo hacen en solitario.

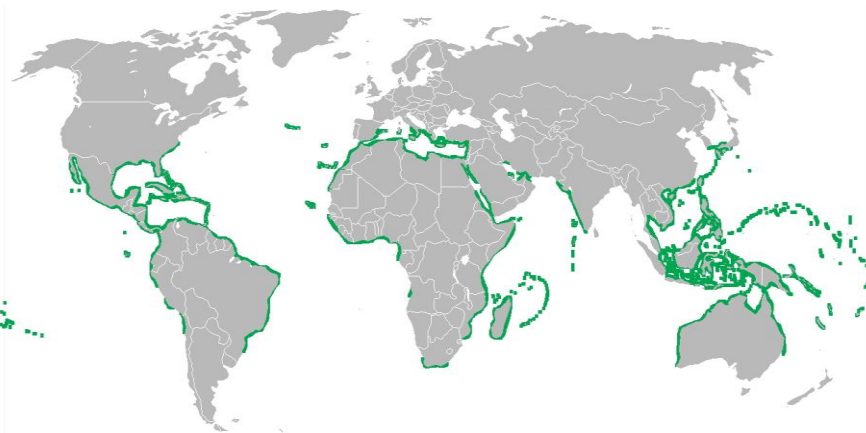


Figura 1.5 Distribución global de la seriola mediterránea (*Seriola dumerili*).
Fuente: www.fishbase.org

Se trata de una especie con los sexos separados, diferenciables en los juveniles de entre 4 y 5 meses de edad y con una longitud media de a partir de 24 - 25,5 cm. La seriola alcanza la madurez sexual a los 4 o 5 años de edad, aunque ocurre primero en las hembras que en los machos (Kozul et al., 2001; Marino et al., 1995). La época de puesta en el medio natural suele darse con el aumento de la temperatura en

primavera, aunque puede variar en función del área geográfica (Lazzari & Barbera, 1988), si los reproductores son jóvenes el periodo de puesta es más prolongado (Marino et al., 1995). La época de desove es cerca de las costas y en zonas más protegidas durante los meses de abril y mayo.

En la reproducción en cautividad pese a las referencias sobre la obtención de puestas aplicando técnicas de inducción hormonal (Lazzari et al., 2000; Mylonas et al., 2004) se han tenido problemas, y no ha sido posible conseguir su reproducción en cautividad de forma natural obteniendo puestas espontáneas hasta entrado el siglo XXI (Jerez et al., 2006).

4. Situación actual de la *Seriola dumerili* en acuicultura

La seriola mediterránea no es la única especie del género *Seriola* que se comercializan, principalmente es la zona asiática la mayor productora de estas especies. El género más representativo es la seriola japonesa (*Seriola quinqueradiata*) que se empezó a criar en los años 60 y tiene una producción anual en torno a las 150 mil toneladas, especialmente en Japón y China (FAO, 2022).

Otra especie que ha tenido gran desarrollo en países como Australia, Chile, Japón o Sudáfrica es la *Seriola lalandi*. Se producen más de 10.000 toneladas de esta especie principalmente en Australia y Japón.

En cuanto a la *Seriola rivoliana*, se ha señalado como una especie con potencial en Sudáfrica, según (O'Neill et al., 2015). Actualmente se producen alrededor de 500 toneladas de esta especie en el sur de Estados Unidos y Hawai, como se menciona en el estudio de Aguilar-Manjarrez et al. (2013).

La seriola (*Seriola dumerili*) es una especie emergente dentro del género y la segunda más importante que actualmente se produce en Japón, Taiwán, China, Emiratos Árabes y España. Su producción se inició en Japón en 1978 y actualmente tiene una gran relevancia, aunque los datos de este país incluyen todas las especies del género *Seriola* juntas, se estima que la producción de *Seriola dumerili* sería aproximadamente un 30% de estas, unas 39.000 toneladas (FAO,

2018). A partir de la década de los 80, la producción de *Seriola dumerili* se expandió al Mediterráneo, siendo España (Cádiz, Islas Baleares, Murcia y Tarragona), Italia y Malta los principales productores, según Sicuro & Luzzana (2016). En España, donde se alcanzaron las 18 toneladas en el año 2020 y se ha aumentado hasta las 120 en el año 2021 (APROMAR, 2022), los principales retos de la producción comercial pasan por mejorar el proceso de cultivo larvario y la optimización del engorde.

Aunque en principio la seriola mediterránea es un candidato ideal para la utilización de esta en acuicultura, la adaptación a la cautividad no es fácil y por tanto no se ha desarrollado comercialmente tan rápido como se podría esperar. Los principales problemas a los que se enfrenta la producción de seriola mediterránea es la reproducción en cautividad y la susceptibilidad que presenta frente a muchas enfermedades durante la producción.

La reproducción de la *Seriola dumerili* en acuicultura ha sido objeto de estudio desde hace varias décadas (Fakriadis et al., 2020; Jerez et al., 2006; Marino et al., 1995; Sarih et al., 2019; Tachihara et al., 1993; Watanabe et al., 1996) y es un proceso complejo que requiere condiciones controladas para obtener buenos resultados.

Respecto a las patologías relacionadas con la producción las infecciones parasitarias más comunes son causadas por platelmintos monogeneos específicos (*Zeuxapta seriolae*, *Benedenia seriolae* y *Neobenedenia* sp.), el digeneo *Paradeontacylix* sp. y el copépodo *Caligus* sp., pero también se ve afectada por parásitos comunes en la producción de peces como *Amyloodinium* sp. o *Vibrio* sp.

5. La nutrición de la *Seriola dumerili*

Para poder criar una especie en cautividad, uno de los objetivos principales es conocer el pienso que se tiene que utilizar para alimentarla. Por lo tanto, se tiene que estudiar los niveles de nutrientes óptimos que se deben aportar a los peces mediante el pienso, principalmente proteína y lípidos. Esto ha sido estudiado en los primeros trabajos publicados sobre *Seriola dumerili* (Jover et al., 1999; Takakuwa et al., 2006; Tomás-Vidal et al., 2008).

En la actualidad, buscando un desarrollo de la acuicultura más sostenible, donde es necesario reducir al máximo la utilización de las harinas y aceites de pescado como base de los piensos para la acuicultura, se tienen que buscar fuentes alternativas, más económicas y sostenibles, pero que sean capaces de alcanzar las necesidades de la especie.

En varios estudios sobre las necesidades proteicas, se ha demostrado que para tener el máximo crecimiento se necesitan elevadas cantidades de proteína, alrededor de 450-550 g/kg de pienso, mejor si es superior al 50% (Jover et al., 1999; Takakuwa et al., 2006; Tomás-Vidal et al., 2008), aunque también se debe tener en cuenta el nivel de lípidos.

5.1. Potenciales ingredientes alternativos

El uso de la harina y el aceite de pescado en los piensos acuícolas es limitado ya que ha habido una sobreexplotación de los recursos y el precio es elevado por lo que se están buscando ingredientes alternativos para depender en menor medida de la extracción de los recursos pesqueros. Sin embargo, no es sencillo encontrar esos ingredientes alternativos, ya que se debe mantener la salud de los peces, la calidad de la carne o la frescura. Se debe tener en cuenta que la finalidad de la producción acuícola es ofrecer al consumidor alimentos con alto valor nutritivo, especialmente en ácidos grasos poliinsaturados y la sustitución de la HP y AP puede modificar la composición de AAGG del filete.

Los ingredientes alternativos a la harina de pescado son muy variados, tanto de origen animal como vegetal y con precios más competitivos (Martínez-Llorens et al., 2012) lo que reduciría el coste de producción de las empresas acuícolas.

Se han realizado varios estudios probando la sustitución de la harina de pescado, pero aún no se ha conseguido la sustitución al completo de la harina de pescado por una fuente proteica alternativa. Utilizando turtó de soja (Tomás-Vidal et al., 2005) se alcanzó una sustitución factible del 30% sin perjudicar el crecimiento; con harina de ave (Takakuwa et al., 2019) se consiguió una sustitución sin afectar al

crecimiento del 40%, pero con suplementación de aminoácidos se llegó al 60%; con la inclusión de torta de soja más de un 45% de sustitución afectaba al crecimiento y la digestibilidad (Dawood et al., 2015) o utilizando proteína concentrada de soja, un nivel superior al 20% perjudicaba el crecimiento y la eficiencia alimenticia (Takakuwa et al., 2019).

La calidad de la proteína en la dieta de los peces, como la *Seriola dumerili*, se determina por su perfil de aminoácidos y la disponibilidad de estos aminoácidos. Para que las funciones metabólicas sean óptimas, es crucial que los peces ingieran y asimilen los aminoácidos adecuados en proporciones equilibradas, que se acerquen al perfil ideal de aminoácidos presentes en el músculo de los peces (Oliva-Teles, 2012).

La obtención de un buen perfil aminoacídico se logra mediante la combinación adecuada de diferentes fuentes proteicas. Al lograr esto, se puede realizar una sustitución efectiva de la harina de pescado por fuentes proteicas alternativas, lo que resulta en un mejor crecimiento y una mejor retención de nitrógeno. Este enfoque ha demostrado ser exitoso en especies como el salmón (Espe et al., 2006) y la dorada (Kissil & Lupatsch, 2004; Sánchez-Lozano et al., 2009), reduciendo la necesidad de suplementar con aminoácidos sintéticos y minimizando los antinutrientes presentes en la dieta cuando se utilizan fuentes proteicas vegetales (Oliva-Teles, 2012).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que una alta sustitución de la harina de pescado por fuentes proteicas alternativas puede tener efectos adversos en los peces. Esto se debe principalmente a la presencia de antinutrientes en las fuentes vegetales utilizadas (Førde-Skjærvik et al., 2006; Francis et al., 2001; Krogdahl et al., 2005), lo que puede resultar en una baja actividad enzimática, baja digestibilidad de proteínas y un aumento en la susceptibilidad de los peces a patógenos, inmunosupresión y mayores tasas de mortalidad (Estruch et al., 2015; Sitjà-Bobadilla et al., 2005).

Igual que ocurre con la harina de pescado, también es necesaria la sustitución del aceite de pescado por fuentes lipídicas alternativas. En este caso los aceites vegetales se han destacado como sustitutos del

aceite de pescado en la alimentación de peces. Esto se debe a varias razones, como su menor coste, su baja concentración de dioxinas y otros contaminantes orgánicos (Sales & Glencross, 2011), y su disponibilidad en cantidades adecuadas. En comparación con el aceite de pescado, los aceites vegetales más comunes, como el aceite de palma, soja, colza y girasol, son más abundantes y tienen un precio más bajo.

Además, los aceites vegetales son bien utilizados por los peces, ya que son metabolizados y utilizados como fuente de energía. Varios estudios han demostrado que los peces pueden aprovechar eficientemente los aceites vegetales en su dieta (Bell et al., 2001). Sin embargo, uno de los principales desafíos asociados con el uso de aceites vegetales es su composición en ácidos grasos. Estos aceites son relativamente bajos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y en ácidos grasos omega-3 (n-3), mientras que son ricos en ácidos grasos omega-6 (n-6) y omega-9 (n-9). Esta composición desequilibrada limita su uso como única fuente de grasa en la alimentación de peces.

Para la mayoría de los peces marinos, como la *Seriola dumerili*, los ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) de cadena larga, como el ácido eicosapentanoico (EPA), el ácido docosahexanoico (DHA) y el ácido araquidónico (ARA), son esenciales en su dieta (Fountoulaki et al., 2009). Además, son fundamentales para garantizar una adecuada calidad de la carne en los peces (Bell et al., 2002).

Por ello, la sustitución total del aceite de pescado como ingrediente en la alimentación de peces marinos no es teóricamente factible, debido a la necesidad de mantener niveles adecuados de EPA y DHA en los productos destinados al consumo humano. Los alimentos de origen marino son la principal fuente de estos HUFAs en las dietas humanas.

A lo largo de los años, se han llevado a cabo numerosos estudios para sustituir el aceite de pescado por fuentes lipídicas alternativas en diversas especies, incluyendo la dorada (Benedito-palos et al., 2008; Fountoulaki et al., 2009), lubina (Mourente et al., 2007; Torrecillas et al., 2017) o salmón (Olsvik et al., 2007; Torstensen et al., 2000). Estos estudios han demostrado que, siempre y cuando se cubran los niveles mínimos de ácidos grasos esenciales, el crecimiento de los peces no se

ve afectado significativamente. Sin embargo, se han observado importantes modificaciones en los perfiles de ácidos grasos de los tejidos de los peces alimentados con aceites vegetales. Estos peces presentan niveles elevados de ácidos grasos C18 PUFA y una reducción en los niveles de HUFAs n-3, especialmente EPA y DHA (Bell et al., 2001). La naturaleza y el contenido de los lípidos en la dieta influyen considerablemente en la composición muscular (Guillaume et al., 2004). Por lo tanto, la composición de los AAGG corporales refleja los AAGG de la dieta. Así, la sustitución del AP por una fuente alternativa de lípidos, ya sea vegetal o animal, no sólo afecta al crecimiento de los peces y a la eficiencia nutricional, sino que también afecta (Turchini et al., 2009) al perfil de ácidos grasos corporales, como consecuencia de la capacidad de la especie para biosintetizar ácidos grasos.

La sustitución de AP en la dieta se ha relacionado con varios efectos secundarios sobre la salud y el estrés de los peces (Calduch-Giner et al., 2012; Oxley et al., 2010; Serradell et al., 2020), dependiendo del nivel de sustitución de AP, los aceites alternativos incluidos en la dieta, el perfil de ácidos grasos de la dieta y las especies de peces. Un desequilibrio de LC-PUFAs n-3/n-6 desencadena una respuesta de estrés a través de la producción alterada de eicosanoides (Hundal et al., 2021). Además, estudios anteriores también informaron de efectos negativos en los peces alimentados con aceites vegetales, como un aumento de los niveles plasmáticos de cortisol (Ganga et al., 2011) y un nivel elevado de triacilglicerol hepático (Alvheim et al., 2013). La secreción continua de cortisol al torrente sanguíneo tiene efectos negativos sobre la ingesta de alimento de los peces, altera el metabolismo de lípidos y proteínas e induce inmunosupresión, aumentando la susceptibilidad a patógenos e infecciones (Estruch et al., 2015; Ganga et al., 2011; Turchini et al., 2011).

*5.1.1. Ingredientes alternativos en *Seriola* sp.*

Experimentos anteriores con juveniles de *Seriola dumerili* no han reportado efectos adversos en términos de crecimiento, ingesta de alimento e índice de conversión alimenticia, incluso a niveles de sustitución del aceite de pescado del 100%. En la Tabla 1.2 se compara el crecimiento y la supervivencia en diferentes experimentos con peces

del género *Seriola*, se observó que el crecimiento se vio afectado negativamente en peces alimentados con dietas que tenían niveles bajos de EPA y DHA, especialmente con niveles bajos de EPA (menos del 2,5%). La sustitución total del aceite de pescado tuvo efectos negativos en el crecimiento de los peces cuando fue reemplazado por aceite de canola en *Seriola lalandi* (Bowyer, Qin, et al., 2012) y también en *Seriola quinqueradiata* (Fukada et al., 2017), o por aceite de palma (Fukada et al., 2020) y colza (Seong et al., 2022) en *Seriola quinqueradiata*. En todos estos estudios, las dietas que mostraron los peores resultados de crecimiento también tenían los niveles más bajos de DHA y EPA. Esto sugiere que los niveles de DHA y EPA en la harina de pescado no fueron suficientes para satisfacer las necesidades de ácidos grasos de *Seriola* en estos experimentos. Sin embargo, es importante destacar que la reducción en el crecimiento no afectó la supervivencia (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Comparación de DHA, EPA, TGC y supervivencia en estudios con sustitución de HP y AP en *Seriola* sp.

	Peso inicial	Peso final	Días	Nivel AP	Aceites alter *	Nivel HP	Harinas alternativas **	DHA EPA (% total AAGG)		CTC	Supervi-vencia
<i>S. lalandi</i> (Bowyer, Qin, et al., 2012)	101.1	170.2	32	100		50	Tr Atp	8.1	11.2	0.00152	100
		166.7		0	AAv	50	Tr Atp	2.7	1	0.00145	100
		141.3		0	AC	50	Tr Atp	2.3	0.9	0.00094	100
		180.6		50	AAv	50	Tr Atp	6.5	7.7	0.00171	100
		163.4		50	AC	50	Tr Atp	5.9	7	0.00139	100
	95.6	265.9	35	100		50	Tr Atp	8.1	11.2	0.00241	100
		236.8		0	AC	50	Tr Atp	2.3	0.9	0.00209	100
		262.1		0	AAv	50	Tr Atp	2.7	1.1	0.00247	100
		259.1		50	AC	50	Tr Atp	5.9	7	0.00234	100
		276.1		50	AAv	50	Tr Atp	6.5	7.7	0.00251	93
<i>S. quinqueradiata</i> (Fukada et al. 2020) ***	19.1	93	56	100		69	HK	12.4	11.8	0.00144	93.3
		86.5		0	AAv AC	69	HK	7.6	7.4	0.00135	90.7
		91.8		0	AAv AC	69	HK HAg	9.1	7.7	0.00142	94.7
		97.8		0	AAv AC	69	HK HAg	12.4	7.8	0.00150	97.3
		96.8		0	AAv AC	69	HK HAg	13.8	7.6	0.00148	98.7
		94.4		0	AAv AC	69	HK HAg	16.9	8.2	0.00146	97.3
	104.7	305.3	69	100		100		12.1	9.8	0.00114	95.6

Salud intestinal de la *Seriola dumerili* alimentada con ingredientes
alternativos a la harina y aceite de pescado

		276.5		75	AC	100		10.7	8	0.00100	95.6
		308		50	AC	100		9.4	6.2	0.00114	100
		269.7		0	AC	100		6.7	2.5	0.00097	97.8
(Khaoian et al., 2014)	236	1434.3	252	100		60	HSD HCM ATp			0.00097	100
		1377.3		100		35	HSD HCM ATp			0.00084	99
		1497.3		100		35	HSD HCM ATp			0.00100	97
		1442		60	AAv	35	HSD HCM ATp			0.00097	99
(Seno-o et al., 2008)	252	414	40	100		100		9.4	9.9	0.00122	100
		425.4		75	AO	100		8.4	8.3	0.00129	100
		404.4		50	AO	100		7	6.4	0.00115	100
		406.5		0	AO	100		4.8	3.1	0.00117	100
(Seong et al., 2022) Experimento 1	190.6	691.2	99	100		50	HS PCM HAv HPI Tr	9.1	9.6	0.00123	97.5
		498.4		100		0	HS PCM HAv HPI Tr	8	0.4	0.00086	95
		226.4		0	ACz	0	HS PCM HAv HPI Tr	8.1	0.1	0.00013	95
(Seong et al., 2022) Experimento 2	186	511.4	84	100		0	CPS HS HPI HAv ATp	8	12.3	0.00111	97.5
		493.2		65	ACz	0	CPS HS HPI HAv ATp	7.9	7.4	0.00106	100
							HAg GM				
		415.7		30	ACz	0	CPS HS HPI HAv ATp	8.4	3.4	0.00085	95
							HAg GM				
		329.5		0	ACz	0	CPS HS HPI HAv ATp	8	0.1	0.00058	100
							HAg GM				
<i>S. dorsalis</i> (Stuart et al., 2021)	20	151.9	64	100		0	Spi HSAv PCM Tr	9.8	17.4	0.00186	100

		146.3	0	AAg	0	Spi HSAv PCM Tr	43.6	14.1	0.00181	100
		108.6	0	AS	0	Spi HSAv PCM Tr	1.2	1.2	0.00146	98.3
		186	100		25	Spi HSAv PCM HS Tr	10.9	17.2	0.00212	98.3
<i>S. dumerili</i>										
(Monge-Ortiz, et al., 2018)										
39.2	390	154	100		52	Tr GTr	11.1	15.1	0.00118	75
	397		50	AL AP	52	Tr GTr	7.9	10.7	0.00119	74
	375		0	AL AP	52	Tr GTr	5.1	5.85	0.00115	74

Un texto de color diferente indica diferencias significativas entre los tratamientos, en azul la mejor dieta y en rojo la peor.

* aceite linaza (AL), aceite girasol (AG), aceite de palma (AP), aceite ave (AAv), aceite de canola (AC), aceite oliva (AO), aceite de colza (ACz), aceite de alga (AAG) and aceite de soja (AS)

** Harina de soja desgrasada (HSD), gluten de maíz (GM), trigo (Tr), almidón de tapioca (ATp), proteína concentrada de soja (CPS), harina de calamar (HC), harina de soja (HS), harinas de plumas (HPI), salvado de arroz desgrasado (ASD), harina de subproductos de ave (HSAv), harina de ave (HAv), harina de alga (HAg), spirulina (Spi), proteína concentrada de maíz (PCM), harina de cerdo ibérico (HClb), gluten de trigo (Gtr), harina de krill (HK) and harina vegetal (HV)

*** Harina de alga, aceite de canola y aceite de palma fueron usadas para sustituir AP en diferentes proporciones. Las cantidades de AC y AP disminuyeron con el aumento de HAg añadida a concentraciones de 0% (AM0), 1% (AM1), 2% (AM2), 3% (AM3) y 4% (AM4).

6. Efecto en la salud intestinal de la utilización de ingredientes alternativos en peces

Se han observado diversas alteraciones histomorfológicas en el intestino de peces en respuesta a dietas basadas en vegetales (Krogdahl et al., 2010). La capacidad de digerir eficientemente fuentes vegetales varía entre especies, y la tolerancia a los factores antinutricionales de origen vegetal, que podrían ser la causa de las alteraciones en la morfología intestinal, y esto parece depender tanto de la especie (Bonaldo et al., 2008) como de la sección del intestino (Baeza-Ariño et al., 2016a), la edad del pez (Martínez-Llorens, Tomás-Vidal, et al., 2007) o/y la fuente y nivel de proteína vegetal (Martínez-Llorens et al., 2012; Øverland et al., 2009). Además, los cambios morfológicos pueden reflejar la adaptación del sistema digestivo a las fuentes vegetales. Por ejemplo, en la dorada se ha observado una adaptación trófica efectiva a dietas vegetales, con un aumento compensatorio en la longitud relativa del intestino (Santigosa et al., 2008) y en las vellosidades intestinales (Aslaksen et al., 2007), lo que permite a los peces carnívoros aumentar la superficie funcional para la digestión y compensar una menor actividad enzimática en la membrana intestinal (Buddington et al., 1987).

En el caso de los salmónidos, con bastantes trabajos publicados al respecto, se ha observado con frecuencia la presencia de cambios histopatológicos e inflamación en el intestino distal, especialmente enteritis cuando se incluye harina de soja en la dieta (Krogdahl et al., 2010).

Otro efecto que se puede observar, con la inclusión de vegetales, es la síntesis y secreción de mucina en el intestino, que están relacionadas con la inmunidad innata y los procesos inflamatorios que ocurren en este órgano (Sitjà-Bobadilla et al., 2005). El moco intestinal está estrechamente asociado con la microbiota comensal, y los cambios en su composición pueden modular la colonización del tracto intestinal por diferentes grupos bacterianos (Estensoro et al., 2013). Por lo tanto, la sustitución de la harina de pescado por vegetales en la dieta, que puede provocar disfunciones inmunitarias (Sitjà-Bobadilla et al., 2005) o cambios en la microbiota intestinal (Silva et al., 2011), al igual que

también puede resultar en alteraciones cualitativas o cuantitativas en la secreción de mucina (Álvarez-Pellitero, 2013).

Por otro lado, se ha demostrado que la composición y diversidad de la microbiota intestinal de los peces está fuertemente influenciada por factores dietéticos y nutricionales (Merrifield & Ringø, 2014) y este impacto se ha evaluado en la última década utilizando diferentes técnicas (Cerezuela et al., 2013; Dimitroglou et al., 2009; Moutinho et al., 2017).

La inclusión de altos niveles de proteínas vegetales en los piensos de acuicultura para especies carnívoras puede generar estrés y desencadenar una respuesta inmunitaria en los peces (Tort, 2011). Estos efectos perjudiciales en el sistema inmunitario pueden manifestarse a través de alteraciones morfológicas en el epitelio intestinal, cambios en la composición de la microbiota y disfunciones en la barrera epitelial, lo que a su vez puede desencadenar una respuesta inflamatoria inicial (Baeza-Ariño et al., 2016).

A corto plazo, el sistema inmunitario generalmente se ve menos afectado, pero en períodos prolongados de estrés, los mecanismos inmunitarios que requieren un suministro continuo de energía pueden debilitarse, lo que puede conducir a efectos depresivos o supresivos (Tort, 2011) y, en última instancia, a enfermedades en los peces (Martin & Król, 2017). Además, una respuesta inmunitaria sostenida también puede afectar el rendimiento animal al redirigir la energía y otros recursos hacia diferentes procesos fisiológicos para hacer frente al estrés (Martin & Król, 2017). En la trucha arco iris, se ha observado una supresión de la capacidad inmunitaria innata (Burrells et al., 1999), pero también se han registrado procesos inflamatorios o estimulación inmunitaria en otros estudios (Krogdahl et al., 2000).

La evaluación de la morfología intestinal en peces alimentados con dietas ricas en proteínas vegetales ha revelado algunas alteraciones morfológicas relacionadas con un estado inflamatorio, aunque en general no se han observado signos histopatológicos en la dorada. Sin embargo, la evaluación de la respuesta inmunitaria y los mecanismos que la regulan requieren más que simplemente observar la morfología. En teleósteos, se han registrado cambios en marcadores inflamatorios

e inmunitarios en el intestino cuando se alimentan con dietas bajas en harina de pescado, lo que indica una respuesta proinflamatoria común. En la lubina, se ha observado un aumento de diferentes citoquinas proinflamatorias en el intestino distal, junto con un agrandamiento de la capa submucosa y un impacto negativo en la capacidad del tejido linfoide asociado al intestino para combatir infecciones bacterianas (Torrecillas et al., 2017).

En los salmónidos que desarrollan enteritis, se ha observado una regulación al alza a corto plazo de varios genes relacionados con la inmunidad, pero también de genes relacionados con la proteólisis, el transporte, el metabolismo y la detoxificación (Sahlmann et al., 2013). Los autores sugieren que el mantenimiento de un estado inflamatorio durante varios días puede explicar la posterior regulación a la baja de genes relacionados con la endocitosis, exocitosis, detoxificación, transporte y procesos metabólicos, lo que lleva a una disminución en la capacidad digestiva, protectora y metabólica del intestino. Incluso en especies omnívoras como la carpa común (*Cyprinus carpio*), la inclusión parcial de proteínas vegetales ha demostrado una alta expresión génica de diversos marcadores inflamatorios, alteraciones morfológicas, infiltración celular y disminución de la capacidad de absorción de los enterocitos (Urán et al., 2008). En general, se sugiere que la respuesta inflamatoria e inmunitaria depende de la especie, pero las fuentes vegetales son potenciales agentes inflamatorios (Francis et al., 2001).

7. Adición de probióticos en los piensos

Debido a todo lo dicho en el apartado anterior, el uso de probióticos en la acuicultura ha sido estudiado en varias especies, como en dorada (Cerezuela et al., 2012; Moroni et al., 2021), lubina (Adorian et al., 2019), salmón (Nimalan et al., 2023; C. Wang et al., 2019) o trucha (Merrifield, Dimitroglu, et al., 2010; Ramos et al., 2015). Los probióticos son microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, pueden ejercer efectos beneficiosos en la salud de los organismos. En el caso de los peces, los probióticos pueden colonizar el tracto digestivo, en particular el epitelio de la mucosa gastrointestinal, desplazando a los patógenos y mejorando así el

estado de salud de los peces (Jöborn et al., 1997; Korkea-aho et al., 2012; Lazado et al., 2011; Merrifield, Dimitroglou, et al., 2010).

Además de desplazar a los patógenos, se ha observado que el uso de probióticos mejora las actividades del sistema inmunitario innato en los peces, como la función de los fagocitos (neutrófilos y macrófagos), el estado respiratorio, la actividad de la lisozima, la actividad de la peroxidasa y la antiproteasa (Akhter et al., 2015). También se ha observado que modulan las comunidades microbianas en el tracto gastrointestinal y mejoran las respuestas inmunitarias sistémicas (Merrifield & Ringø, 2014). Estos efectos son especialmente relevantes en peces alimentados con dietas que contienen altas sustituciones de harina y aceite de pescado, ya que pueden ayudar a mitigar el estrés y la inmunosupresión asociados con dichas dietas, lo que aumenta la susceptibilidad a patógenos (Martin & Król, 2017; Montero et al., 2008).

Además de los efectos inmunológicos, el uso de probióticos en las dietas de peces puede modificar la microbiota intestinal y generar efectos beneficiosos, como mejorar la conversión y digestibilidad del alimento (De Schrijver & Ollevier, 2000; Je et al., 2019; ten Doeschate & Coyne, 2008).

Varios estudios han demostrado que el uso de probióticos puede aumentar significativamente la supervivencia y el rendimiento de los peces alimentados con dietas ricas en ingredientes vegetales (Acar & Türker, 2018; Liu et al., 2020). Estos probióticos pueden mejorar el sistema inmunitario de los peces y contrarrestar los efectos de la inmunosupresión asociada con las dietas de alta sustitución de ingredientes marinos.

Capítulo 2:

JUSIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El sector acuícola se enfrenta actualmente al desafío de expandir su oferta de nuevos productos y desarrollar nuevas especies para aumentar la rentabilidad de la producción. Entre estas especies, la seriola mediterránea (*Seriola dumerili*) se presenta como una candidata prometedora debido a su rápido crecimiento y alta calidad de la carne. Para lograr una producción comercial exitosa de seriola mediterránea, es crucial desarrollar piensos que promuevan un crecimiento eficiente, una alta eficiencia en el aprovechamiento del alimento y bajas tasas de mortalidad.

No obstante, el uso de harinas y aceites de pescado en la alimentación de peces está limitado tanto por cuestiones económicas como medioambientales. Por lo tanto, es esencial encontrar alternativas sostenibles y respetuosas con el medio ambiente para formular piensos específicos que no comprometan la productividad de la seriola mediterránea.

Hasta ahora, los estudios sobre la sustitución de harinas y aceites de pescado por fuentes proteicas y lipídicas alternativas en los piensos para *Seriola dumerili* son escasos y limitados. Por lo tanto, es necesario investigar y desarrollar estrategias adecuadas que permitan formular piensos nutricionalmente completos y efectivos para esta especie sin depender en gran medida de harinas y aceites de pescado. Del mismo modo también es necesario evaluar los beneficios que se pueden producir en los peces la adición de probióticos

El objetivo principal de este trabajo es contribuir a encontrar niveles de sustitución de HP y AP en un pienso específico que se ajuste a las necesidades nutritivas de la seriola mediterránea, minimizando el uso de harinas y aceites de pescado, pero sin comprometer el crecimiento, el aprovechamiento nutricional y la salud de los peces. Mediante esta investigación, se busca promover una acuicultura más sostenible y eficiente, garantizando al mismo tiempo la viabilidad económica y el respeto al medio ambiente.

Para llevar a cabo este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales (aceite de palma, girasol y linaza) en distintas proporciones en piensos para *Seriola dumerili*, centrándose en los siguientes aspectos:
 - Crecimiento, parámetros nutritivos y supervivencia.
 - Composición de ácidos grasos.
 - Histología intestinal y hepática.
 - Estrés oxidativo.
 - Parámetros hematológicos.
 - Microbiota intestinal.
 - Adición de probióticos.

- Evaluar el efecto de la sustitución de la harina de pescado por fuentes proteicas alternativas, tanto animales (harina de carne y krill desgrasado) como vegetales (trigo, gluten de trigo y gluten de maíz), en piensos para *S. dumerili*, abordando los siguientes aspectos:
 - El crecimiento y supervivencia.
 - Microbiota intestinal.
 - Histología intestinal y hepática.

Capítulo 3:

RESUMEN DE EXPERIMENTOS

La presente tesis doctoral fue dividida en 3 experimentos como puede apreciarse en la Figura 3.1.

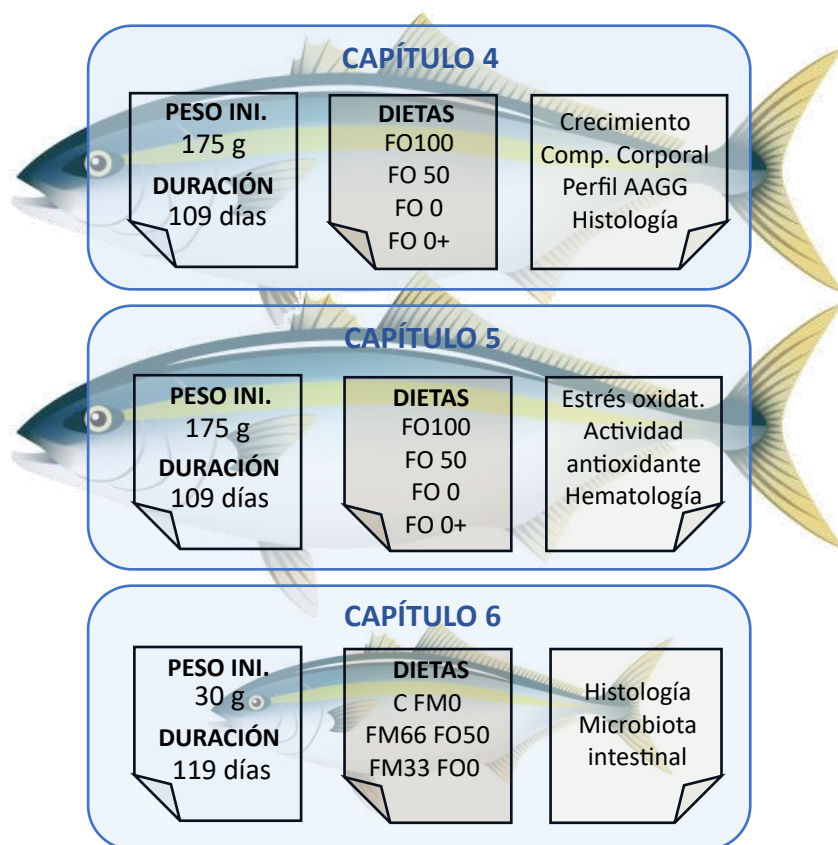


Figura 3.1 Resumen de los experimentos realizados durante esta tesis doctoral. Elaboración propia.

Los trabajos publicados han tenido financiación por parte de distintas administraciones como:

- Generalitat Valenciana: “Ingredientes alternativos en piensos para *Seriola dumerili*: efecto en el crecimiento y en la calidad de la carne”. Ref: AICO/2015/123.
- Universitat Politècnica de València. Ayudas para investigadores predoctorales para publicación PAID-12-21. “*Seriola dumerili*”.

- Gobierno de España: Ministerio de Economía y Empresa “sustitución de harina y aceite de pescado en dietas para *Seriola dumerili*. Pruebas de alimentación y estudios analíticos: proteínas”. Ref: AGL2011-30547-C03-02.

Capítulo 4:
Efecto de la sustitución de Aceite de
pescado y adición de probióticos en
el crecimiento, composición corporal
y parámetros histológicos en la
seriola mediterránea (*Seriola*
***dumerili*)**

Publicado en *Aquaculture Nutrition* DOI:10.1111/anu.13171

1. SPECIFIC OBJECTIVES

- Evaluate the replacement of fish oil with a mixture of vegetable oils in the diet of *S. dumerili* and the addition of probiotics, and their impact on the growth and nutritional parameters.
- Analyze the composition of fatty acids in *S. dumerili* as a result of the substitution of fish oil with vegetable oils.
- Study the effects on the histology of the digestive system of *S. dumerili* as a result of the substitution of fish oil and the addition of a probiotic composed of *Lactobacillus brevis* and *L. buchneri*.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Fish and experimental diets

The trial was carried out with juvenile fish (*S. dumerili*) obtained from the Futuna Blue S.A. company (Cádiz, Spain). The average weight of fish was 175 g. Before starting the growth trial, the animals had been allowed to acclimatize (one month) to the new conditions of the laboratory. During this time, fish were fed up to apparent satiation, twice daily (9:00 a.m.-16:00 p.m.) with a control diet, six days a week. Water parameters had been constantly monitored: temperature $21.5 \pm 2.4^{\circ}\text{C}$, salinity 31 g/L (31.5 ± 4.1 g/L), pH 7.5 to 8.0 and dissolved oxygen 8 mg/L. The photoperiod was natural, and all tanks had similar light conditions. Following the acclimatization period, a total of 300 fish were randomly distributed in 12 tanks (25 fish/tank). The fish redistribution into tanks was conducted in a way that limited stress. The animals were anaesthetized with clove oil at 30 mg/L, containing 87% of eugenol (Guinamas, Valencia, Spain).

The period of the trial was of 109 days. Four isolipidic diets (15% CF, crude fat) and isoproteic diets (52% CP, crude protein) were formulated. Diets were formulated with different levels of fish oil replacement with a mixture of vegetable oils.

The diets composition is shown in Table 4.1. FO 0+ diet had the same formulation than FO 0 with the addition of probiotics *Lactobacillus brevis* and *L. buchneri*, which were added daily to the pellet by spraying it directly before eating (50 ml for 500 g).

Table 4.1. Feed Ingredients and proximate composition of the experimental diets.

	FO 100	FO 25	FO 0
Ingredients (g/kg)^u			
Fishmeal	350	350	350
Wheat meal	100	100	100
Wheat gluten	140	140	140
Soybean meal	185	185	185
Iberian pig meal	110	110	110
Fish oil	95	24	0
Linseed oil	-	28	38
Sunflower oil	-	21	28
Palm oil	-	22	29
*Multivitamin and minerals mix	20	20	20
Analysed composition (% dry weight)			
Dry matter (%DM)	89.3	89.7	89.4
Crude protein (%CP)	52.2	52.5	52.1
Crude lipid (%CL)	14.5	14.4	14.4
Ash (%)	7.3	9.1	7.4
Calculated values			
^uEnergy (kJ/g)	21.4	21.3	21.2

^u Fishmeal (crude protein, CP: 70.7%; crude lipids, CL: 8.9%; Carbohydrates, CHO: 6.0%; Ash: 15.1%); Wheat meal (CP: 14.0%; CL: 2.4%; CHO: 83.0%; Ash: 2.4); Wheat gluten (CP: 70.9%; CL: 1.3%; CHO: 34.1%; Ash: 1.5%), Soybean meal (CP: 34.3%; CL: 1.3%; CHO: 34.1%; Ash: 1.5%), Iberian pig meal (CP: 66.4%; CL: 16.3%; Ash: 1.9%)

*Multivitamin and minerals mix (values are g/kg except those in parenthesis): Premix: 25; Choline, 10; DL-a-tocopherol, 5; ascorbic acid, 5; (PO₄)₂Ca₃, 5. Premix composition: retinol acetate, 1000000 IU kg⁻¹; calciferol, 500 IU/kg; DL-a-tocopherol, 10; menadione sodium bisulfite, 0.8; thiamine hydrochloride, 2.3; riboflavin, 2.3; pyridoxine hydrochloride, 15; cyanocobalamin, 25; nicotinamide, 15; pantothenic acid, 6; folic acid, 0.65; biotin, 0.07; ascorbic acid, 75; inositol, 15; betaine, 100; polypeptides 12.

^uEnergy (%) = (51.8 x (%C/100)) - (19.4 x (%N/100)). Calculated according to Brouwer (1965)

2.2. Biometric parameters, growth indices and proximate composition

At the end of the growth trial, five fish were randomly sampled from each tank to determine the biometric parameters and to carry out the proximate composition analysis. The following indices were calculated:

$$\text{Specific Growth Rate } \left[\frac{\%}{d} \right], SGR = \frac{100 \times \ln \left(\frac{\text{final weight}}{\text{initial weight}} \right)}{\text{days}}$$

$$\text{Feed Intake ratio} \left[\frac{g}{100 \text{ g fish} \cdot d} \right], FI = \frac{100 \times \text{Feed intake} [g]}{\text{Average biomass} [g] \cdot \text{days}}$$

$$\text{Feed Conversion Ratio, FCR} = \frac{\text{Feed intake} [g]}{\text{Weight gain} [g]}$$

$$\text{Condition Factor} \left[\frac{g}{cm^3} \right], SGR = \frac{100 \times \text{Total fish weight} [g]}{\text{Total length}^3}$$

$$\text{Viscerosomatic index [\%], VSI} = \frac{100 \times \text{Visceral weight} [g]}{\text{Total fish weight} [g]}$$

$$\text{Hepatosomatic index [\%], HSI} = \frac{100 \times \text{Liver weight} [g]}{\text{Total fish weight} [g]}$$

$$\text{Mesenteric Fat index [\%], MFI} = \frac{100 \times \text{Visceral weight} [g]}{\text{Total fish weight} [g]}$$

$$\begin{aligned} &\text{Dressout Percentage [\%], DP} \\ &= \frac{100 \times (\text{Fish weight} [g] - \text{Visceral weight} [g] - \text{Head weight} [g])}{\text{Total fish weight} [g]} \end{aligned}$$

$$\text{Muscle index [\%], MI} = \frac{100 \times \text{Muscle weight} [g]}{\text{Total fish weight} [g]}$$

2.3. Chemical analysis

Chemical analyses of the dietary ingredients were performed prior to diet formulation. The proximate composition of whole fish and fish diets were analysed according to (AOAC., 1990) procedures: dry matter, official method 934.01 (105°C to constant weight); ash, official method 942.05 (incinerated at 550°C for 5 hr); crude protein, official method 990.03 (determined by direct combustion method DUMAS using LECO CN628) and crude lipid, official method 920.39 (extracted with methyl-ether using ANKOMXT10 Extractor). All analyses were performed in triplicate.

The following indices were calculated:

$$\text{Protein Productive Value [\%](PPV)} = \frac{100 \times \text{Protein fish gain} [g]}{\text{Protein intake} [g]}$$

$$\text{Fat Productive Value [\%](FPV)} = \frac{100 \times \text{Fat fish gain} [g]}{\text{Fat intake} [g]}$$

$$\text{Energy Productive Value [\%]}(EPV) = \frac{100 \times \text{Energy fish gain [g]}}{\text{Energy intake [g]}}$$

Fatty acids were determined by direct synthesis of methyl esters (FAME) and analysed by gas chromatography on a FINNIGAN FOCUS 6C chromatograph (AI 3,000) (O'Fallon et al., 2007).

2.4. Histological analysis

Samples of proximal and distal intestine from three fish per tank were taken at the end of the experiment, fixed in formalin, dehydrated in a different ethanol concentration and fixed in paraffin. Sections (5µm) were stained with PAS-Alcian blue and observed through light microscopy.

The histological analysis performed was a quantitative analysis. Measurements used a combination of parameters proposed by different authors (Adamidou et al., 2009; Øverland et al., 2009; Santigosa et al., 2008). Specifically, the histological analysis focused on the measurement of length and width of the intestinal villus. Six villi were measured for each of the three fish collected in each of the three tanks belonging to the same treatment. In addition, the thickness of the lamina propria, of the submucosa, muscular and serous layer were analysed.

All the images of samples were taken with an optical microscope Nikon JAPON 0.90. The images were analysed using Photoshop software and a conversion into metric units.

2.5. Statistical analysis

Growth data, nutrient utilization, biometric parameters, body composition, fatty acids composition and histological analysis were treated using multifactor analysis of variance (ANOVA). The Newman-Keuls test was used to assess specific differences among diets at .05 significant levels (Statgraphics, Statistical Graphics System, Version Centurion XVI, Warrenton, Virginia, USA).

2.6. Ethical statement

The *Seriola dumerili* study complied with the European Union Council Directive 2010/63/UE, which sets out standards for the protection of animals and Spanish legislation (Spanish Royal Decree 53/2013) that protect animals used in experimentation. The experimental protocol was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Universitat Politècnica de València (UPV).

Fish in the tanks were checked twice daily. Additionally, every month fish were weighed individually, and their health status was assessed by way of observation after sedation with clove oil dissolved in water (0.01 mg/L of water). Animals were euthanized by an excess of clove oil (150 mg/L) and later dissected and analysed.

3. RESULTS

3.1. Composition of diets

Composition and concentration of the fatty acids diets reflect the concentrations of the types of oils used in each of them (Table 4.2). Thus, the diets containing fish oil lipid source had a higher quantity of highly unsaturated essential fatty acids of the n-3 chain (HUFA n-3). On the other hand, diets where vegetable oils such as linseed, sunflower and palm were used as a lipid source were characterized by a greater quantity of linoleic and linolenic fatty acids, respectively.

Table 4.2 Fatty profile (g 100/g, wet matter) of experimental diets.

	FO 100	FO 25	FO 0	FO 0+
14:0	0.319	0.249	0.185	0.160
15:0	0.002	0.003	0.002	0.002
16:0	1.839	2.045	2.122	1.894
17:0	0.052	0.025	0.018	0.016
18:0	0.494	0.510	0.528	0.482
Σ Saturated^a	2.707	2.831	2.855	2.554
16:1	0.411	0.289	0.204	0.180
18:1n-9	2.643	3.096	3.663	3.270
18:1n-7	0.384	0.307	0.273	0.245
22:1n-9	0.031	0.004	0.007	0.008
Σ MUFA^a	3.470	3.695	4.147	3.703
18:2n-6	1.233	1.395	1.666	1.508

18:3n-6	0.010	0.009	0.010	0.008
20:3n-6	0.010	0.004	0.004	0.005
20:4n-6	0.099	0.061	0.039	0.036
22:4n-6	0.023	0.020	0.010	0.010
Σ n-6 PUFA^a	1.375	1.488	1.730	1.567
18:3n-3	0.218	1.095	1.637	1.444
20:3n-3	0.015	0.008	0.006	0.005
20:5n-3 EPA	0.566	0.453	0.311	0.283
22:5n-3	0.126	0.076	0.047	0.046
22:6n-3 DHA	1.264	0.795	0.480	0.448
Σ n-3 PUFA^a	2.189	2.427	2.481	2.227
Σ n-3 HUFA^a	1.956	1.324	0.838	0.777
EPA/DHA^b	0.448	0.569	0.648	0.632
DHA/EPA^b	2.23	1.75	1.54	1.58
n-3/n-6	1.592	1.631	1.434	1.421

Σ Saturated: saturated fatty acids sum; Σ MUFA: monounsaturated fatty acids sum;
 Σ n-6 PUFA: n-6 polyunsaturated fatty acids sum; Σ n-3 PUFA: n-3 polyunsaturated fatty acids sum. Σ n-3 HUFA: n-3 highly unsaturated fatty acids sum.

^aIncluding some minor components not shown.

^bDHA/EPA, 22:6 n-3/20:5 n-3; EPA/ARA, 20:5 n-3/20:4n-6

3.2. Growth, nutritional and biometric parameters

During the 109 days of the growth trial, no negative effects were found with either partial and complete fish oil substitution with vegetable oil or the inclusion of probiotics on growth and feed performance of *S. dumerili* (Table 4.3). However, if differences in survival were found, fish fed the FO 25 treatment showed the highest value, while fish fed the FO 0+ diet the lowest. All diets were readily accepted by the fish and no significant differences were reported in feed intake (1.1 g/100 fish per day), food conversion ratio (1.6) or specific growth ratio (0.8%/day).

Table 4.3 Effect of dietary fish oil replacement on growth performance, survival and nutrient utilization of *S. dumerili* after 109 days of feeding.

	Diets			
	FO 100	FO 25	FO 0	FO 0+
Initial weight (g)	175.2	171.5	175.3	180.8
	± 3.62	± 3.62	± 3.62	± 3.62
Final weight (g)	422.7	409.1	419.3	422.6
	± 5.25	± 5.25	± 5.25	± 5.25

WI^a (g)	247.4 ± 7.03	241.0 ± 7.03	244.0 ± 7.03	241.8 ± 7.03
Survival (%)	89.67 ± 2.88 ^{ab}	92.67 ± 2.88 ^a	80.33 ± 2.88 ^{bc}	77.33 ± 2.88 ^c
SGR^b (% day)	0.8 ± 0.013	0.8 ± 0.013	0.8 ± 0.013	0.8 ± 0.013
FI^c	1.1 ± 0.034	1.1 ± 0.034	1.1 ± 0.034	1.1 ± 0.034
FCR^d	1.5 ± 0.07	1.5 ± 0.07	1.6 ± 0.07	1.6 ± 0.07

The values represent the mean ± SD (n=3). Different superscripts letters indicate significant differences between treatments (p<0.05). Newman-Keuls Test..

^a Weight Increase = final weight – initial weight

^b Specific growth rate (%/day) SGR = 100 x ln (final weight/initial weight)/feeding days.

^c Feed Intake (g 100 g / (fish day)). FI = 100 x feed intake (g)/average biomass (g) x days.

^d Feed Conversion Ratio FCR = feed intake (g)/weight gain (g).

In general, biometric indices were similar in all treatments analysed as is shown in Table 4.4, except the viscerosomatic index (VSI), which was higher in yellowtail fed with the FO0+ diet.

Table 4.4 Biometric indices of *S. dumerili* after 109 of feeding the experimental diets.

	FO 100	FO 25	FO 0	FO 0+
CF^a	1.51 ± 0.02	1.50 ± 0.02	1.53 ± 0.02	1.58 ± 0.02
VSI^b (%)	5.94 ± 0.15 ^b	5.99 ± 0.15 ^b	6.36 ± 0.15 ^{ab}	6.55 ± 0.15 ^a
HSI^c (%)	1.69 ± 0.09	1.86 ± 0.09	1.94 ± 0.04	1.96 ± 0.09
MSI^d (%)	0.36 ± 0.05	0.49 ± 0.05	0.45 ± 0.05	0.45 ± 0.05
DP^e (%)	72.4 ± 0.32 ^a	72.2 ± 0.32 ^{ab}	71.2 ± 0.32 ^b	71.9 ± 0.32 ^{ab}
MI^f (%)	48.5 ± 0.6	48.5 ± 0.6	47.5 ± 0.6	48.6 ± 0.6

The values represent the mean ± SD (n=3). Different superscripts letters indicate significant differences between treatments (p<0.05). Newman-Keuls Test.

^aCondition factor. CF= = 100 x Total fish weight [g]/Total length³ [cm³]

^bViscerosomatic index (%). VSI = 100 x Visceral weight [g]/Total fish weight [g]

^cHepatosomatic index (%). HSI = 100 x Liver weight [g]/Total fish weight [g]

^dMesenteric fat index (%). MSI 100 x Mesenteric fat weight [g]/Total fish weight [g]

^eDressout percentage (%). DP = 100 x (Total fish weight [g] - Visceral weight [g] -Head weight [g])/Total weight

^fMuscle index (%). MI = 100 x Muscle weight [g]/Total fish weight [g]

3.3. Body composition

Body composition and productive values are shown in Table 4.5. No significant differences were found in crude fat, dry matter and ashes in fish composition. Conversely, crude protein results indicated significant differences between treatments FO 25 and FO 0+. No significant differences were found in productive values.

Table 4.5 Initial and final proximal composition (g 100/g, wet weight), crude energy content (MJ/kg) and productive values in *S. dumerili* fed with the different experimental diets, after 109 days of feeding the experimental diets.

	Initial	FO 100	FO 25	FO 0	FO 0+
Crude protein	17.94	18.65 ± 0.22 ^{ab}	19.5 ± 0.22 ^a	18.73 ± 0.22 ^{ab}	18.3 ± 0.22 ^b
Crude fat	6.07	8.69 ± 0.35	8.92 ± 0.35	8.58 ± 0.35	9.13 ± 0.35
Dry matter	26.4	30.45 ± 0.31	30.84 ± 0.31	29.64 ± 0.31	30.09 ± 0.31
Ash	2.65	2.87 ± 0.16	2.82 ± 0.16	2.79 ± 0.16	2.61 ± 0.16
Energy	6.02	7.18 ± 0.12	7.33 ± 0.12	7.11 ± 0.12	7.32 ± 0.12
PPV^a (%)		25.7 ± 1.33	26.3 ± 1.33	24.1 ± 1.33	22.5 ± 1.33
FPV^b (%)		52.6 ± 3.39	56.1 ± 3.39	46.7 ± 3.39	52.3 ± 3.39
EPV^c (%)		26.1 ± 1.51	26.9 ± 1.51	24.0 ± 1.51	24.7 ± 1.51

The values represent the mean ± standard error (n=3). Different superscripts letters indicate significant differences between treatments (p<0.05). Newman-Keuls Test.

^aProtein productive value. PPV= 100 x Protein fish gain [g]/Protein intake [g]

^bFat productive value. FPV = 100 x Fat fish gain [g]/Fat intake [g]

^cEnergy productive value. EPV = 100 x Energy fish gain [g]/Energy intake [g]

The fatty acid profile (g 100/g in wet weight) of the juveniles of yellowtail fed during the experiment is shown in Table 4.6. Fish fed the FO 25, FO 0 and FO 0+ diets (including high levels of vegetable oils) presented significantly higher concentrations of α -linolenic acid and the EPA/ DHA ratio, while fish fed the control diet (FO 100), presented significantly greater proportions of 20:3n6 acid, arachidonic acid and

docosahexaenoic acid (DHA). The amount of eicosapentaenoic acid (EPA) did not differ significantly between treatments that contained fish oil lipid source (FO 100 and FO 25) (Table 4.6).

Table 4.6 Composition of fatty acids (g 100/g, wet weight) of the whole body of *S. dumerili* fed with experimental diets for 109 days.

	Initial	FO 100	FO 25	FO 0	FO 0+
14:0	0.120	0.178 ± 0.009 ^a	0.141 ± 0.009 ^b	0.119 ± 0.009 ^b	0.126 ± 0.009 ^b
15:0	0.007	0.006 ± 0.0003	0.007 ± 0.0003	0.007 ± 0.0003	0.007 ± 0.0003
16:0	0.762	1.20 ± 0.06	1.18 ± 0.06	1.14 ± 0.06	1.21 ± 0.06
17:0	0.017	0.031 ± 0.001 ^a	0.022 ± 0.001 ^b	0.019 ± 0.001 ^b	0.020 ± 0.001 ^b
18:0	0.365	0.46 ± 0.02	0.48 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.51 ± 0.02
Σ Saturated^a	1.13	1.87 ± 0.10	1.82 ± 0.10	1.76 ± 0.10	1.88 ± 0.10
16:1	0.161	0.296 ± 0.013 ^a	0.225 ± 0.013 ^b	0.189 ± 0.013 ^b	0.204 ± 0.013 ^b
18:1n-9	1.290	2.286 ± 0.126 ^b	2.436 ± 0.126 ^{ab}	2.655 ± 0.126 ^{ab}	2.900 ± 0.126 ^a
18:1n-7	0.171	0.306 ± 0.012 ^a	0.261 ± 0.012 ^{ab}	0.231 ± 0.012 ^b	0.259 ± 0.012 ^{ab}
22:1n-9	0.013	0.023 ± 0.001 ^a	0.008 ± 0.001 ^b	0.004 ± 0.001 ^b	0.004 ± 0.001 ^b
Σ MUFA^a	1.635	2.911 ± 0.149	2.929 ± 0.149	3.079 ± 0.149	3.368 ± 0.149
18:2n-6	0.967	1.144 ± 0.062 ^b	1.273 ± 0.062 ^{ab}	1.313 ± 0.062 ^{ab}	1.440 ± 0.062 ^a
18:3n-6	0.006	0.007 ± 0.0006	0.007 ± 0.0006	0.007 ± 0.0006	0.007 ± 0.0006
20:3n-6	0.005	0.010 ± 0.0007 ^a	0.005 ± 0.0007 ^b	0.003 ± 0.0007 ^b	0.003 ± 0.0007 ^b
20:4n-6	0.409	0.066 ± 0.003 ^a	0.049 ± 0.003 ^b	0.036 ± 0.003 ^b	0.039 ± 0.003 ^b
22:4n-6	0.009	0.016 ± 0.0009 ^a	0.013 ± 0.0009 ^{ab}	0.009 ± 0.0009 ^b	0.010 ± 0.0009 ^b
Σ n-6 PUFA^a	1.396	1.244 ± 0.067	1.347 ± 0.067	1.368 ± 0.067	1.500 ± 0.067

Salud intestinal de la *Seriola dumerili* alimentada con ingredientes alternativos a la harina y aceite de pescado

18:3n-3	0.256	0.279 ± 0.056 ^c	0.672 ± 0.056 ^b	0.830 ± 0.056 ^{ab}	0.913 ± 0.056 ^a
20:3n-3	0.007	0.016 ± 0.002 ^b	0.020 ± 0.002 ^{ab}	0.023 ± 0.002 ^{ab}	0.028 ± 0.002 ^a
20:5n-3 EPA	0.180	0.281 ± 0.020 ^a	0.220 ± 0.020 ^{ab}	0.163 ± 0.020 ^b	0.173 ± 0.020 ^b
22:5n-3	0.071	0.138 ± 0.009 ^a	0.102 ± 0.009 ^b	0.069 ± 0.009 ^b	0.081 ± 0.009 ^b
22:6n-3 DHA	0.525	0.851 ± 0.051 ^a	0.584 ± 0.051 ^b	0.406 ± 0.051 ^b	0.446 ± 0.051 ^b
Σ n-3 PUFA^a	1.039	1.565 ± 0.120	1.599 ± 0.120	1.490 ± 0.120	1.643 ± 0.120
n-3/n-6	0.744	1.258 ± 0.057	1.189 ± 0.057	1.085 ± 0.057	1.094 ± 0.057
EPA/DHA^b	0.342	0.330 ± 0.011 ^b	0.376 ± 0.011 ^a	0.407 ± 0.011 ^a	0.386 ± 0.011 ^a

The values represent the mean ± standard error (n=3). Different superscripts letters indicate significant differences between treatments (p<0.05). Test de Newman-Keuls. Σ Saturated: saturated fatty acids sum; Σ MUFA: monounsaturated fatty acids sum; Σ n-6 PUFA: n-6 polyunsaturated fatty acids sum; Σ n-3 PUFA: n-3 polyunsaturated fatty acids sum.

^aIncluding some minor components not shown.

^bEPA/DHA calculated as 20:5 n-3/22:6 n-3

Table 4.7 Fatty acids productive values (FAPV) (% by wet weight) in *S. dumerili* fed with experimental diets for 109 days.

	FO 100	FO 25	FO 0	FO 0+
14:0	51.1 ± 3.47	47.9 ± 3.47	49.9 ± 3.47	51.3 ± 2.83
16:0	59.3 ± 3.07	54.3 ± 3.07	50.5 ± 3.07	52.6 ± 2.51
17:0	58.9 ± 6.67 ^b	73.7 ± 5.44 ^{ab}	88.7 ± 6.67 ^a	88.5 ± 5.44 ^a
18:0	68.6 ± 4.63	82.0 ± 4.63	79.6 ± 4.63	82.0 ± 3.78
Σ Saturated	69.1 ± 5.82	64.3 ± 5.82	61.6 ± 5.82	73.6 ± 5.82
16:1	70.6 ± 5.07	70.0 ± 5.07	78.3 ± 5.07	83.6 ± 4.14
18:1n-9	75.9 ± 5.14	71.9 ± 4.19	74.5 ± 5.47	81.0 ± 4.19
18:1n-7	76.77 ± 4.0	77.5 ± 4.0	75.9 ± 4.0	84.7 ± 3.26
Σ MUFA^a	83.8 ± 5.72	79.3 ± 5.72	77.2 ± 5.71	88.6 ± 5.71
18:2n-6	66.2 ± 3.68	79.6 ± 3.68	69.9 ± 3.68	75.9 ± 3.0
18:3n-6	56.1 ± 2.88 ^a	71.0 ± 3.52 ^a	34.4 ± 3.52 ^b	59.5 ± 3.52 ^a
20:4n-6	55.1 ± 9.58	56.6 ± 9.58	63.5 ± 9.58	73.6 ± 9.58

22:4n-6	67.3 ± 3.53 ^{ab}	56.1 ± 3.53 ^{bc}	47.0 ± 3.53 ^c	74.8 ± 3.53 ^a
Σ n-6 PUFA^a	90.4 ± 5.76	90.5 ± 5.76	81.3 ± 5.76	92.7 ± 5.76
18:3n-3	93.8 ± 3.24 ^a	65.8 ± 3.24 ^b	45.2 ± 3.24 ^c	67.3 ± 3.24 ^b
20:5n-3 EPA	39.5 ± 5.94	41.2 ± 5.94	38.9 ± 5.94	45.5 ± 5.94
22:6n-3 DHA	64.2 ± 8.91	54.1 ± 7.27	56.3 ± 8.91	63.0 ± 8.91
Σ n-3 PUFA^a	71.5 ± 6.87	65.9 ± 6.87	60.1 ± 6.87	73.7 ± 6.87

The values represent the mean ± standard error (n=3). Different superscripts letters indicate significant differences between treatments (p<0.05). Newman-Keuls Test.

ΣSaturated: saturated fatty acids sum; Σ Ms: monounsaturated fatty acids sum; Σ n-6 PUFA: n-6 polyunsaturated fatty acids sum; Σ n-3 PUFA: n-3 polyunsaturated fatty acids sum.

^aIncluding some minor components not shown.

Results of the fatty acid productive values are shown in Table 4.7. In comparison with the control diet (58.9 g/100 g), the retention efficiency of fish fed diets with 100% vegetable mixtures oils (FO 0 (88.7 g/100 g) and FO 0+ (88.5 g/100 g)) showed higher retention efficiencies of 17:0 acid, while only the group of fish fed the FO 0 diet indicated significant efficiencies under 18:3n-6, 22:4n-6 acid and 18:3n-3. In the case of EPA and DHA, no significant differences were found between treatments.

3.4. Histological observations

The results of anterior and posterior intestine measurements are reported in Tables 4.8 and 4.9, respectively.

Table 4.8 Histological measurements of the anterior intestine in yellowtail fed the experimental diets for 109 days.

	FO100	FO25	FO0	FO0+
SL (μm)	76.8 ± 10.1	102.8 ± 10.7	92.1 ± 9.6	94.4 ± 10.2
ML (μm)	258.4 ± 23.0	321.3 ± 25.0	329.7 ± 22.4	286.9 ± 24.0
SML (μm)	167.4 ± 16.3 ^a	241.1 ± 19.3 ^b	230.4 ± 171.1 ^b	202.8 ± 17.0 ^{ab}
VL (μm)	1623.8 ± 91.3	1692.0 ± 125.9	1555.6 ± 104.1	1796.7 ± 92.1
WVL (μm)	139.5 ± 6.0	119.2 ± 8.0	123.4 ± 6.7	139.5 ± 6.0
WLP (μm)	26.4 ± 2.0	26.4 ± 2.5	21.4 ± 2.1	26.8 ± 2.0
WLP/WVL	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01

The values represent the mean $\pm$ standard error (n= 3). Different superscripts letters indicate significant differences between treatments (p<0.05). Newman-Keuls Test.

SL: Thickness of serosa layer, ML: Thickness of muscular layer, SML: Thickness of submucosa layer, VL: Villus length, WVL: Width villi, WLP: Width of *lamina propria*, WLP/WVL: ratio between Width of *lamina propria* and villi.

In the anterior intestine differences only appear in the thickness of the submucosa layer, thinner in the control diet. No statistically significant differences were identified in the length and width of the villi and lamina propria. For all treatments, the ratio between the width of the lamina propria and the width of the villus was very similar.

In the posterior intestine, the thickness of serosa (SL), muscularis (ML) and submucosa (SML) of the four treatments showed no statistically significant differences among fish fed the different diets. However, significant differences were identified in the length of the villi and in the width of the lamina propria. Particularly, FO 25 shows the lower length of villi value, which is statistically different from the FO 100, FO 0 and FO 0+ diets.

Table 4.9 Histological measurements of the posterior intestine in fish fed the experimental diets for 109 days.

	FO100	FO25	FO0	FO0+
SL(μm)	95.1 $\pm$ 8.4	67.0 $\pm$ 11.3	83.2 $\pm$ 8.1	96.9 $\pm$ 9.0
ML(μm)	200.8 $\pm$ 26.2	217.7 $\pm$ 33.0	278.2 $\pm$ 22.3	269.6 $\pm$ 24.9
SML(μm)	195.3 $\pm$ 15.3	207.3 $\pm$ 19.8	176.0 $\pm$ 14.7	199.7 $\pm$ 16.8
VL(μm)	1447.3 ^b $\pm$ 68.4	993.7 ^a $\pm$ 65.5	1448 ^b $\pm$ 59.4	1539.2 ^b $\pm$ 68.4
WVL(μm)	129.1 $\pm$ 6.6	136.8 $\pm$ 6.2	145.5 $\pm$ 5.7	131.9 $\pm$ 6.6
WLP(μm)	18.5 ^a $\pm$ 1.6	22.0 ^{ab} $\pm$ 1.5	25 ^b $\pm$ 1.4	18.2 ^a $\pm$ 1.6
WLP/WVL	0.1 $\pm$ 0.01	0.2 $\pm$ 0.01	0.2 $\pm$ 0.01	0.1 $\pm$ 0.01

The values represent the mean $\pm$ standard error (n=3). Different superscripts letters indicate significant differences between treatments (p<0.05). Newman-Keuls Test.

SL: Thickness of serosa layer, ML: Thickness of muscular layer, SML: Thickness of submucosa layer, VL: Villus length, WVL: Width villi, WLP: Width of *lamina propria*, WLP/WVL: ratio between Width of *lamina propria* and villi.

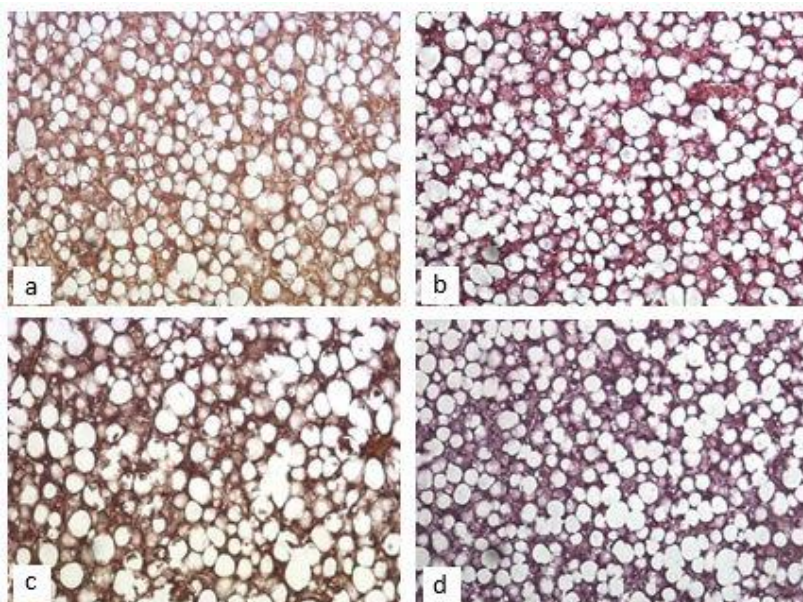


Figure 4.1 Microphotographs of liver section (a) FO 100 (20x). b) FO 25 (20x). c) FO 0+ (20x). d) FO 0 (20x) of yellowtail. Hematoxylin and eosine staining.

Regarding liver histology, the cells count and their respective measurement (diameter and core) were not possible because of the remarkable steatosis present in samples of all treatments (Figure 4.1). As *Seriola dumerili* is a lean fish, accumulates lipids in the liver. The hepatocytes, which should be of polygonal form with a central nucleus, are deformed by the diffuse presence of lipid droplets to the point that their shape is not perceptible.

4. DISCUSSION

The present study indicates that it is possible to substitute practically all FO from the feed for juveniles of yellowtail (*S. dumerili*) with a mixture of vegetable oils (palm, linseed and sunflower), without causing adverse effects on growth, fish performance and nutritional parameters. This is similar to what happens in other species, such as the California halibut (*Paralichthys californicus*; Badillo-Zapata et al., (2010), the gilthead seabream (*Sparus aurata*) in a work of Benedito-Palos et al., (2007) or rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Acar et al., 2018; Parrino et al., 2019; Thanuthong et al., 2011).

The fatty acid composition of the diets formulated with 100 (FO 100) and 25% (FO 25) fish oil as a lipid source, showed higher concentrations of essential fatty acids (EFA), ARA, EPA and DHA, while, as was expected, feed formulated with 100% mixtures of linseed, palm and sunflower oils without (FO 0) and with probiotic supplementation (FO 0+), were characterized by high levels of 18: 1n-9, 18: 2n-6 and 18: 3n-3, respectively. The mixture of vegetable oils provides n-3/ n-6 and EPA/DHA balanced ratios, similar to that obtained in our previous formulation in diets for Mediterranean yellowtail (Monge-Ortiz, Tomás-Vidal, Rodríguez-Barreto, et al., 2018). This did not suppose a disadvantage, neither in the growth nor in the nutritious parameters of the M. yellowtail, due to all the diets covered the requirements of EPA, DHA and of highly unsaturated fatty acids of chain n-3 (n-3 HUFA), possibly because the amount of FO present in FM (350 g/kg) was sufficient to reach the minimum needs of EFA in yellowtail 175 g initial weight. It is possible to make diets for *Seriola spp.* With levels of EPA and DHA around 0.5% (Guillaume et al., 2004), even in the case of EPA, it could be with levels of 0.3%, since no differences in growth have been found.

Although the substitution of fish oil for mixtures of vegetable oils did not affect the growth and nutritional parameters in Mediterranean yellowtail, it has a negative effect on survival, it could be explained by the deficiency of essential fatty acids in diets without fish oil, because this reduction may lead to immunosuppression in fish (Montero et al., 1998, 2003), as it has been reported in other fish species.

Substitutions above 75% of the FO by mixtures of VO significantly affect yellowtail survival. The addition of the probiotic did not improve survival in this experiment, similar to were reported in rabbitfish (*Siganus rivulatus*) (El-Dakar et al., 2007) and in dentex (*Dentex dentex*) (Hidalgo et al., 2006). Probiotics act on both innate and adaptive gut immunity. The microorganisms they contain can stimulate the production of certain components of the immune system, such as the secretion of cytokines. In addition, certain probiotics can induce differentiation of mature B lymphocytes and the production of antibodies. Despite the large number of studies, it is currently

unknown exactly how probiotics interact with lymphoid cells in the intestine to achieve activation of the intestinal immune system but it is a fact that so happens. The use of probiotics that had been studied in other species such as poultry, pigs or cattle, has given good results, improving intestinal health and growth in fish (Dimitroglou et al., 2009). Probiotics (*Lactobacillus brevis* and *L. buchneri*) were added to improve the digestibility of nutrients and to strengthen the immune system of the host (Akhter et al., 2015) in non-fish oil diet, but results were not as expected. In other species, such as tilapia (*Oreochromis niloticus*; Aly et al., (2008), sole (*Solea senegalensis*) (Sáenz De Rodríguez et al., 2009) and golden pompano (*Trachinotus ovatus*; Liu et al., (2020)), the use of probiotics in diets has been shown to improve nutrient digestibility and survival.

Nonetheless, the use of probiotics in aquaculture can pose difficulties, and it is important to take into account two factors of great influence: the selection of the strains and their stability that allows obtaining an effective density. It can be the cause of the non-effectivity in present work, probiotics must be specifically selected from the hosts in which they are to be used, since in this way the effects caused by the wide differences between the environments in which organisms develop are minimized. But similar results were obtained in Atlantic salmon, the use of probiotics increased their mortality (Gildberg et al., 1995) or in sea bream (*Sparus aurata*) where probiotics addition caused intestinal damage (Cerezuela et al., 2012, 2013).

Therefore, it is possible that the probiotics used could not have helped to strengthen the immune system in the FO 0+ treatment because the species used are not the most suitable for the yellowtail. A close relationship between FA dietary level and fish survival was observed in present trial. In fact, Izquierdo et al. (2003) reported that sea bream fed diets without fish oil for 204 days demonstrated effects in both humoral and cellular immunology. Montero et al., (2008) reported that the inclusion of dietary vegetable oils modified the fish content and ratio of arachidonic and eicosapentaenoic acids, altering in turn the production of immunologically active eicosanoids derived from these fatty acids. Specifically, in present work conditions, it is therefore

possible to hypothesize that the monthly handling of fish may have generated stressful situations for the animals. Probably, fish fed with FO 0 and FO 0+ diets received enough n-3 HUFA, EPA and DHA for their growth but insufficient to complete the immunologic system, whereas diets FO 0 and FO 0+ showed the lowest n-3 HUFA values. Specifically, n-3 HUFA requirements for marine species, such as red seabream (*Pagrus major*), yellowtail (*Seriola lalandi*) and turbot (*Psetta maxima*), range from 0.5% to 2.0% of dry diet (Kiron et al., 1995; Montero et al., 1998; Salze et al., 2010) detected that the immune response of rainbow trout and sea bream was depressed when the diet was deficient in EPA and DHA. Furthermore, an EFA unbalanced contribution could change the membrane fatty acid composition of immune cells such as leucocytes (Montero et al., 2008).

In fact, dietary fatty acids influence the lipid composition of membrane cells and their physical properties, exerting a profound effect on the activity of enzymes associated with membranes and receptors, and on immune response, as many of these responses are based on interactions on the cell membrane of leucocytes (e.g. cytokinin production). Although dietary fatty acids may affect the production of eicosanoids derived from fatty acids of 20 carbon atoms (mainly EPA and arachidonic acid, ARA), eicosanoids include prostaglandins, leukotrienes and lipoxins, which are involved in various physiological processes such as osmoregulation and immune response (Rolapleszczynski & Stankova, 1992; Uhing et al., 1990).

While the effect of improving nutritional parameters in the diet is not reflected, due to fish fed with and without probiotics exhibited very similar results, some differences between both treatments were found in gut histology. The anterior intestine submucosa thickness of fish fed control and the FO 0+ diet was similar as the width of the lamina propria in the posterior, which can be explained by the assumption that probiotics have helped to reduce LP inflammation. In the other histological parameters studied, no differences were found between diet, as it has been reported in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) where the probiotic slightly modified the size of the villi without finding significant differences (Je et al., 2019). Despite this, in present work,

the substitution of fish oil has not noticed very relevant effects on intestinal histology. The massive steatosis observed in all liver samples highlights a dysregulation of lipid metabolism. These results are in agreement with several previous works; Fountoulaki et al., (2009) found that sea bream fed dietary lipids from vegetable origin seemed to increase lipid accumulation in liver at a different degree according to the fat origin, palm oil being superior to soybean oil, which was superior to rapeseed oil which was superior to fish oil. In particular, livers from fish fed with palm oil diet showed apparent steatosis, with intense lipid accumulation. The integrity of the hepatocytes was also affected; swelling and nuclei displacement were evident in all examined livers. Again, Benedito-Palos et al. (2008) studied the effect of feeding sea bream with diets rich in vegetable oil, and reported that fish showed fatty livers, in particular with signs of lipid liver disease. Under present work conditions, all livers studied present steatosis, perhaps it is because the yellowtail needs diets with low fat level and the excess is accumulated in the liver, as was demonstrated by Tomás-Vidal et al. (2005) where yellowtail fed with 14% CF diets got better growth and nutritional results than fishes fed with 17% CF.

In particular, linoleic acid had perhaps been included in diets at too high concentrations for the requirements of yellowtail. As reported by Caballero et al., (2004), this PUFA could be one of the main causes of lipid accumulation in the liver. The authors suggest that the type of non-essential fatty acid, characteristic of vegetable oils, induces the appearance of steatosis in the following order: linoleic acid > linolenic acid > oleic acid. Moreover, another possible explanation of the remarkable steatosis presented could be related to the lack of the dietary phospholipids. Lu et al., (2008) reported that the dietary inclusion of soybean phospholipid (PL) to *Pelteobagrus fulvidraco* larvae decreased the degree of lipid accumulation in the hepatocytes. Specifically, Ipatova et al., (2004) reported that proven health benefits in the case of soybean phospholipids supplementation include lipid decrease, control of blood levels of cholesterol and triglycerides, stabilization of membrane functions and support of hepatic functions. In the case of *Seriola dumerili*, it is also possible to hypothesize that the rearing conditions have influenced the energy consumption of fish. It

is possible to suppose that swimming limited to the area of the tanks compared to swimming in natural habitat may have contributed to decreasing energy consumption.

Capítulo 5:
Estado oxidativo hepático, muscular
e intestinal y parámetros
plasmáticos de la seriola
mediterránea (*Seriola dumerili*,
Risso, 1810) alimentada con dietas
con sustitución de aceite de pescado
y adición de probióticos.

Publicado en *International Journal of Molecular Sciences*

DOI:0.3390/ijms24076768

1. SPECIFIC OBJECTIVES

- Assess the potential alterations in oxidative stress as a consequence of high dietary fish oil replacement with vegetable oils, considering the balance of n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids.
- Analyze the effects of fish oil replacement on the activities of digestive enzymes, antioxidant enzymes and the potential benefits of adding a probiotic to mitigate these alterations.
- Examine the impact of fish oil replacement with vegetable oils on plasmatic parameters and evaluate the potential advantages of including *Lactobacillus brevis* and *L. buchneri* in the diet.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Fish and experimental diets

Greater amberjack juveniles (*Seriola dumerili*) (160 g $\pm$ 5.3 g) were obtained from Futuna Blue SA company (Cádiz, Spain), and moved to Universitat Politècnica de València facilities. Before starting the experiment, the animals were acclimatized to the laboratory conditions for one month and fed standard feed (52 % protein and 15 % lipids).

Table 5.1 Formulation (g kg⁻¹) of the experimental diets. Feed ingredients and proximate composition.

	FO 100	FO 25	FO 0 ¹
Ingredients (g/kg)			
Fish meal	350	350	350
Wheat	100	100	100
Defatted soybean meal	185	185	185
Iberian meat meal	110	110	110
Fish oil	95	24	0
Linseed oil	-	28	38
Sunflower oil	-	21	28
Palm oil	-	22	29
Multivitamin and minerals mix ²	20	20	20
Analysed composition (% dry weight)			
Dry matter (%DM)	89.3	89.7	89.4
Crude protein (%CP)	52.2	52.5	52.1

Crude lipid (CL)	14.5	14.4	14.4
Ash (%)	7.3	9.1	7.4
EPA (% total FA)	5.8	4.3	2.8
DHA (% total FA)	13	7.6	4.3

¹ FO 0+ diet details are not shown in the table because it had the same ingredients as FO 0 except for the addition of probiotics *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri* (concentration of 5 mL each 500 g). ² Vitamins and mineral mixture (g kg⁻¹): Premix: 25; Hill, 10; DL- α -tocopherol, 5; ascorbic acid, 5; (PO₄)₂Ca₃, 5. Pre mixture Composition: retinol acetate, 1000000 IU kg⁻¹; calciferol, 500 IU kg⁻¹; DL- α -tocopherol, 10; menadione sodium bisulfite, 0.8; hidroclorhidrate thiamine, 2.3; riboflavin, 2.3; pyridoxine hydrochloride, 15; cyanocobalamin, 25; nicotinamide, 15; pantothenic acid, 6; folic acid, 0.65; biotin, 0.07; ascorbic acid, 75; inositol, 15; betaine, 100; 12 polypeptides.

After acclimatization, 25 fish (175 g $\pm$ 3.62 g) per tank were randomly distributed in 12 tanks, three per diet, with a capacity of 1750 L. Fish were fed until apparent satiation, twice daily (9:00 a.m.-16:00 p.m.), six days a week for 109 days. The photoperiod was natural, and all tanks had similar light conditions. Water temperature was maintained between 17.0 °C and 19.1 °C, salinity around 30 $\pm$ 1 (g L⁻¹), oxygen level 6.7 $\pm$ 0.04 (mg L⁻¹), and pH between 7.5 and 7.8. Ammonium, nitrite, and nitrate levels were maintained at 0.18 $\pm$ 0.07, 0.37 $\pm$ 0.05, and 93.2 $\pm$ 6.88 (mg L⁻¹), respectively.

Four isoproteic (52 % crude protein) and isolipidic (15 % crude lipids) feeds were formulated (Table 5.1): a control diet (FO-100) without FO substitution, a diet with 25 % of FO (FO-25) and another diet without FO inclusion (FO-0). FM provided 3% of CL in all diets. Additionally, a fourth diet was prepared (FO-0+), with the same formulation as FO-0 but adding *Lactobacillus brevis* and *L. buchneri* (5.0 $\times$ 10⁷ UCF g⁻¹) with a mix of 50% of each species as probiotic bacteria.

2.2. Diets chemical analysis

Diets chemical analyses were carried out in the Animal Science Technology at *Universitat Politècnica de Valencia*. The fatty acid composition was analyzed by gas chromatography on a FINNIGAN FOCUS 6C chromatograph (AI 3000), after direct synthesis of methyl esters (FAME) prepared according to O'Fallon (O'Fallon et al., 2007).

Dry matter (105 °C to constant weight), ash (by incineration at 550 °C to constant weight), fat (Ankom XT10 extraction system), and protein content (by Dumas method) were determined according to (AOAC., 1990). The Dumas method consisted of the transformation of nitrogen into a gaseous state by calcination and its determination by thermal conductivity using a LECO CN 628 protein analyzer. All analyses were performed in triplicate.

2.3. Enzymes activity and lipid peroxidation determination in muscle, liver and fish intestine

At the end of the experiment, liver, foregut, and hindgut samples of 3 fish per tank (9 fish per group) were collected and immediately frozen using liquid nitrogen and stored at -80 °C for later analysis. Muscle was also collected, the red muscle was carefully dissected from white muscle, and both tissues were immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -80 °C for later analysis.

Liver and intestine samples were diluted 1:9 and 1:4, respectively, and homogenized at pH 7.8 in ice-cold 100 mM Tris-HCl buffer containing 0.1 mM EDTA and 0.1 % (v/v) Triton X-100. Homogenates were centrifuged at 30,000× g for 30 min at 4 °C and the resulting supernatants were separated into aliquots and stored at -80 °C for further enzyme assays. All enzyme activities were measured at 37 °C on a Multiskan GO microplate reader (Model5111 9200; Thermo Scientific, Nanjing, China).

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH; EC 1.1.1.49) activities were assayed as described by (Morales et al., 1990). Enzyme activities were determined by monitoring changes in NADH or NADP absorbance at 340 nm.

Oxidative stress enzymes were assayed as follows: superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity was measured at 550 nm by the ferricytochrome C method using xanthine/xanthine oxidase as a source of superoxide radicals (McCord & Fridovich, 1969). Catalase activity (CAT; EC 1.11.1.6) was determined according to (Aebi, 1984) by measuring the decrease in hydrogen peroxide concentration at 240 nm. Glutathione reductase activity (GR; EC 1.6.4.2) was determined at

340 nm by measuring NADPH oxidation as described by (Morales et al., 2004). Glutathione peroxidase activity (GPX; EC 1.11.1.9) was assayed as described. The GSSG generated by GPX was reduced by (Flohé & Günzler, 1984) GR and the rate of NADPH consumption was monitored at 340 nm.

One unit of SOD enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to produce a 50 % inhibition of the reduction rate of ferricytochrome C. All other enzyme activities were expressed as units (CAT) or milliunits (G6PDH, GPX, and GR) per milligram of soluble protein (specific activity). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to transform 1 μ mol of substrate per minute under the assay conditions. Total protein concentration was determined according to (Bradford, 1976) as described above.

Liver, intestine (foregut and hindgut), and muscle (white and red) lipid peroxidation levels were determined as malondialdehyde concentration (MDA), according to (Buege & Aust, 1978). A 100 μ L aliquot of supernatant from the homogenate was mixed with 500 μ L of a prepared solution [15 % (w/v) TCA (Sigma), 0.375 % (w/v) thiobarbituric acid (Sigma), 80 % (v/v) HCl 0.25 N and 0.01 % (w/v) butylated hydroxytoluene (BTH) (Sigma)]. The mixture was heated to 100 °C for 15 min, cooled to ambient temperature, and centrifuged at 1500 g for 10 min. The supernatant was collected and the absorbance was measured at 535 nm. Concentration was expressed as nmol MDA per g of wet tissue.

2.4. Glutathione and oxidative stress index in liver

Portions of the liver were homogenized in nine volumes of an ice-cold solution containing 1.3 % 5-sulphosalicylic acid (w/v) and 10 mM-HCl. Homogenates were centrifuged at 14,000 g for 10 min at 4 °C, and the supernatants were analyzed.

Total glutathione (tGSH) and GSSG were measured following the method described by (Griffith, 1980) and (Vandeputte et al., 1994) with modifications. Both tGSH and GSSG analyses were carried out at 37 °C, and changes in absorbance due to the reduction of 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) were monitored at 405 nm in a Multiskan

GO microplate reader. The molar extinction coefficient used for DTNB was $13,600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. tGSH was determined using a reaction mixture containing 133 mM-phosphate buffer with 5.8 mM-EDTA at pH 7.4, 0.71 mM DTNB, 0.24 mM-NADPH, and 1.2 IU/mL GR. GSSG was measured using an aliquot from the solution obtained after 60 min of incubation of 100 μL of the sample with 2 μL vinylpyridine and 6 μL 1.5 M-triethanolamine. The reaction mixture contained 122 mM-phosphate buffer with 5.4 mM-EDTA at pH 7.4, 0.71 mM-DTNB, 0.24 mM-NADPH, and 1.2 IU mL^{-1} GR.

Results were calculated using standard curves of reduced glutathione (GSH) and GSSG for tGSH and GSSG measurements, respectively. GSH level was calculated by subtracting GSSG from tGSH values. Data are expressed as nmol per gram of tissue. The oxidative stress index (OSI) was calculated as, $\text{OSI (\%)} = 100 \times (2 \times \text{GSSG/tGSH})$.

2.5. Blood parameters

At the end of the experiment, 15 fish per experimental group, were anesthetized and blood samples were collected by puncture of the caudal vein using heparinized syringes with an anticoagulant. Samples were immediately stored at 4 °C for later analysis.

Glucose, LDH, cholesterol, and triglyceride concentrations were determined by ultraviolet spectrophotometry (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, EUA), and cortisol by chemiluminescence. The red blood cell count was determined in a Neubauer chamber, the hematocrit percentage by manual microhematocrit method, and hemoglobin by spectrophotometry. All analyses were performed by the ICTIOVET S.C.P. laboratory.

2.6. Statistical análisis

Data were evaluated by analysis of variance (ANOVA), following a completely randomized design. To determine significant differences between treatments, the Bonferroni test was applied at the 5 % significance level, using the statistical program Statgraphics Centurion XVII.

3. RESULTS

3.1. Fish and experimental diets

Diet composition did not affect the oxidative stress enzyme activity in the liver and intestine, except for glucose-6-phosphate dehydrogenase, where activity was higher in the liver of the FO-100 group and lower in the FO-0 group (Table 5.2).

Table 5.2 Antioxidant enzyme activities¹ in liver, foregut, and hindgut of Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerili*) fed the experimental diets for 109 days.

	Diets			
	FO-100	FO-25	FO-0	FO-0+
<i>Catalase</i>				
Liver	808 ± 97.1	695 ± 125.9	596 ± 90.4	746 ± 137.5
Foregut	65.8 ± 13.27	72.8 ± 14.07	64.0 ± 14.07	42.3 ± 15.05
Hindgut	26.6 ± 12.15	30.5 ± 14.94	37.7 ± 11.50	12.0 ± 15.30
<i>Superoxide dismutase</i>				
Liver	127 ± 18.8	152 ± 18.8	121 ± 18.8	141 ± 91.8
Hindgut	74.7 ± 15.75	77.5 ± 19.42	56.5 ± 15.03	39.9 ± 19.22
<i>Glutathione reductase</i>				
Liver	12.4 ± 0.749	12.0 ± 0.764	13.3 ± 0.746	11.6 ± 0.765
Foregut	58.6 ± 8.56	55.5 ± 8.56	42.5 ± 8.56	30.0 ± 10.48
Hindgut	24.0 ± 2.98	23.3 ± 3.70	25.2 ± 2.80	22.0 ± 4.05
<i>Glutathione peroxidase</i>				
Liver	50.6 ± 5.87	55.8 ± 7.66	58.2 ± 5.49	52.9 ± 7.98
Foregut	435 ± 70.1	443 ± 70.1	324 ± 70.1	289 ± 79.4
Hindgut	154 ± 22.0	144 ± 22.0	126 ± 25.4	116 ± 20.7
<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>				
Liver	98.6 ± 11.89 ^a	88.4 ± 15.35 ^{ab}	54.7 ± 11.16 ^b	93.0 ± 15.19 ^{ab}
Foregut	6.42 ± 1.40	5.24 ± 1.48	6.04 ± 1.40	4.03 ± 1.71
Hindgut	2.00 ± 0.595	2.85 ± 0.557	3.36 ± 0.557	2.40 ± 0.525

¹Enzyme activities expressed as U mg protein⁻¹ for catalase and superoxide dismutase, and mU mg protein⁻¹ for glutathione reductase, glutathione peroxidase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Values represent the mean ± standard error (n=9). Different superscripts letters indicate significant differences among treatments (p<0.05), Bonferroni test.

The dietary inclusion of probiotics in the FO-0 diet increased the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, which showed no differences compared to the other groups.

Table 5.3 Total glutathione (tGSH), reduced glutathione (GSH), oxidised glutathione (GSSG) and oxidative stress index (OSI) in liver of Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerili*) fed the experimental diets for 109 days.

	Diets			
	FO-100	FO-25	FO-0	FO-0+
tGSH (nmol g ⁻¹ tissue)	1254 ± 92.8	1161 ± 84.7	936 ± 92.8	1025 ± 92.8
GSH (nmol g ⁻¹ tissue)	1211 ± 91.8	1125 ± 83.8	914 ± 91.8	987 ± 91.8
GSSG (nmol g ⁻¹ tissue)	43.3 ± 6.26	35.5 ± 5.72	22.0 ± 6.26	37.7 ± 6.26
GSH/GSSG	44.4 ± 14.4	51.9 ± 14.4	72.6 ± 14.4	27.1 ± 17.1
OSI (%)	7.09 ± 1.14	6.28 ± 1.04	4.52 ± 1.14	7.44 ± 1.14

Values represent the mean ± standard error (n=9). Different superscripts letters indicate significant differences among treatments (p<0.05), Bonferroni test.

No differences were observed in the liver for total, reduced, or oxidized glutathione levels and for oxidative stress index either (Table 5.3). On the other hand, lipid peroxidation (expressed as nmols MDA per gram of tissue) was affected by diet composition in the liver, foregut, and red muscle (Table 5.4). In the liver, MDA was higher in the control group (FO-100) than in the FO-0+ group, while the opposite was observed in the foregut. In red muscle, MDA levels were higher in fish fed FO-100 diets than in those fed the FO-0 and the FO-0+ diets.

Table 5.4 Lipid peroxidation levels (nmols MDA g⁻¹ tissue) in liver, foregut, hindgut, white muscle and red muscle of Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerili*) fed the experimental diets for 109 days.

	Diets			
	FO-100	FO-25	FO-0	FO-0+
Liver	14.2 ± 0.949 ^a	11.8 ± 0.837 ^{ab}	11.3 ± 0.837 ^{ab}	10.7 ± 0.837 ^b
Foregut	10.8 ± 1.86 ^b	12.6 ± 2.36 ^{ab}	11.7 ± 1.72 ^{ab}	18.2 ± 2.44 ^a
Hindgut	11.0 ± 1.59	12.5 ± 1.59	12.6 ± 1.50	11.4 ± 1.59
White muscle	7.74 ± 1.33	6.25 ± 1.54	7.28 ± 1.33	7.15 ± 1.33
Red muscle	8.44 ± 0.468 ^a	7.18 ± 0.505 ^{ab}	5.90 ± 0.438 ^b	6.16 ± 0.413 ^b

Values represent the mean ± standard error (n=9). Different superscripts letters indicate significant differences among treatments (p<0.05), Bonferroni test.

3.2. Blood parameters

As FO substitution increased, the cholesterol level was reduced, and was significantly lower in fish fed the diets deprived of fish oil than in the control (Table 5.5). No further differences were observed regarding the other parameters measured.

Tabla 5.5 Hematological parameters of Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerili*) fed the experimental diets for 109 days.

	Diets			
	FO 100	FO 25	FO 0	FO 0+
Hemoglobin (g/dL)	10.1 ± 0.56	9.56 ± 0.63	9.85 ± 0.46	9.10 ± 0.50
RBC ¹ (number·10 ⁶ /μL)	2.59 ± 0.38	2.46 ± 0.44	2.66 ± 0.38	2.52 ± 0.41
Hematocrit (%)	30.4 ± 6.00	32.1 ± 6.95	30.9 ± 6.08	29.6 ± 6.42
Glucose (mg/dL)	97.3 ± 14.2	129.1 ± 12.0	97.2 ± 12.0	88.4 ± 12.5
Cholesterol (mg/dL)	168.2 ± 7.40 ^a	151.4 ± 7.40 ^{ab}	128.4 ± 7.40 ^b	124.4 ± 7.40 ^b
Triglycerides (mg/dL)	105.8 ± 7.06	103.8 ± 6.54	107.6 ± 6.54	106.6 ± 6.54
LDH ² (U/L)	16,278 ± 3,241.6	10,210 ± 2,873.4	7,049 ± 2,981.9	12,155 ± 2,873.4
Cortisol (μg/dL)	10.8 ± 5.14	13.9 ± 5.70	10.4 ± 5.30	13.8 ± 5.57

¹ Red blood cells; ² Lactate dehydrogenase. Values represent the mean ± standard error (n=14). Different superscripts letters indicate significant differences among treatments (p<0.05), Bonferroni test.

4. DISCUSSION

Previous studies in fish reported an improvement of antioxidant defenses when the level of marine fatty acids was increased in the diet for seabream (Magalhães et al., 2022), and likewise, n-3 HUFA levels influenced the antioxidant capacity of juvenile black seabream, increased n-3 HUFA levels in diet lead to increased MDA content in liver and serum (Jin et al., 2017). Further, fish oil replacement with vegetable oils can negatively affect lipid peroxidation and oxidative stress, which could lead to impaired membrane function and the reduction of endogenous antioxidant enzyme activity in fish (X. Peng et al., 2016). For instance, in a previous study with *Nibea coibor* (Huang et al., 2016) it was observed that both SOD and CAT activities increased as the levels of fish oil substitution increased, being higher in fish fed with a palm oil diet than a fish oil diet. Also in *Oncorhynchus mykiss* broodstock (Khezrian et al., 2020) SOD and GPX increased with

increasing levels of fish oil substitution with vegetable oils. In the same study, liver CAT activity followed a negative relationship with FO substitution. During the last few years, measures have been sought to increase antioxidant defense activity in different fish species. Among them, microbial feed additives showed promising effects on antioxidant enzyme activity (Hoseinifar et al., 2021).

Nevertheless, in the present study, no significant differences in oxidative stress parameters were found despite the different dietary marine fatty acids in the diets, though a tendency to decrease antioxidant enzyme activity as fish oil substitution increased was noticed, suggesting a detriment of the oxidative defenses. This trend is statistically significant only for liver glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity. The major physiological role of G6PD is to produce NADPH (Çiltaş et al., 2003), crucial for reductive biosynthesis (Bianchi et al., 2001) required to renew reduced glutathione (GSH), preserve the integrity of cell membrane sulfhydryl groups, and detoxify hydrogen peroxide and oxygen radicals in cells (Das et al., 2012). Nevertheless, the differences in G6PD was only observed in fish fed with diet FO-0, although the highest mortality was in fishes fed with FO-0+ diet.

MDA levels indirectly reflect the antioxidant capacity and the overall oxidative status of fish (Tan et al., 2018). In the present study, the oxidation status was different depending on the tissue studied. Lipid peroxidation levels were higher in the FO-100 diet in the liver and red muscle than in the other tissues examined. These findings agree with observations in black sea-buckthorn (*Acanthopagrus schlegelii*), increased MDA contents as dietary long-chain polyunsaturated fatty acids levels increased (n-3 LC-HUFAs) (Jin et al., 2017). Previous studies demonstrated that excess n-3 LC-PUFAs in the liver are more likely to cause lipid peroxidation (K. le Lu et al., 2014).

Compared FO-0 with FO-0+, no significant differences were found, the CAT and SOD enzyme activities increased and the decrease of MDA concentrations in the liver in the fish fed with FO-0+ may suggest a slight improvement in the antioxidant capacity of fish. Similar results to those found in common carp (L. Wang et al., 2017) in which

probiotics increased CAT and SOD, as well as antioxidant capacity. Also, in *Pangasianodon hypophthalmus* (Abdel-Latif et al., 2023) they found that the addition of probiotics caused an increase in digestive enzymes and enzyme activity. But in these studies, the difference was notable between the diets containing the probiotic and the control. In our study, the poor effect of the probiotics could be due to the fact that the probiotic species are not the most suitable for *Seriola dumerili* or the concentration of the probiotics or the concentration was not adequate.

The MDA contents of the liver and muscle of fish fed with high levels of vegetable oils significantly decreased, as previously reported in other species (Benedito-Palos et al., 2010; Bordignon et al., 2020; Gou et al., 2021), but in the case of the liver, this decrease was only observed when probiotic was added. To the best of our knowledge, this is the first study that reports the antioxidant capacity of *Lactobacillus* as a probiotic in diets with high fish oil replacement, but results are not conclusive, as the oxidative status levels in response to the dietary inclusion of probiotics were tissue-dependent.

Probiotics in fish should produce metabolites with antioxidative abilities such as glutathione, folate and butyrate (Hoseinifar et al., 2021). These processes could positively influence antioxidant capacity. However, the specific roles of each probiotic species and their effects on antioxidant capacity in fish need further study.

Blood metabolites have been widely used to provide information on the nutritional status and health of fish (Bonvini et al., 2018; Guardiola et al., 2018; Peres et al., 2013). Hematological parameters can be considered good indicators of changes in fish. Situations of anemia, nutritional deficiencies or malnutrition affect hematocrit values (Ribeiro et al., 2015). To our knowledge, no previous studies have assessed blood parameters in response to fish oil substitution in diets for greater amberjack. In this study, except for cholesterol, the blood parameters were not affected by diet composition. Plasma cholesterol significantly decreased with the increase of vegetable oils in the diets. Similar results have been found in other species when fish oil was substituted with vegetable oils, for instance in sea bass *D. labrax* and

black sea bream *Acanthopagrus schlegeli* (S. Peng et al., 2008; Richard et al., 2006). This was expected as VOs are rich in phytosterols which reduce cholesterol levels (Fernández & West, 2005; Plaza, 2001).

Hemoglobin and hematocrit values were lower than those observed in another study in the same species (Dawood et al., 2015), probably due to the differences in fish weight (136 g compared to the 422 g average weight in the present experiment). This has also been noticed in other fish species, such as siluroid (*Heteropneustes fossilis*) (Pandey et al., 1976), where the erythrocytes and leucocytes count and hemoglobin concentration were higher in smaller fishes and decrease as the animal grows and the hematocrit values and mean corpuscular volumes decrease with the increase of fish weight.

In this study, plasma triglycerides levels are within the range reported for greater amberjack under good nutritional status (Dawood et al., 2015). Plasma cortisol, LDH, and glucose variations can be related to differences in diet composition and physiological changes related to stress. In the present study, no differences among treatments were observed in these parameters. This is similar to what was observed in *S. quinquerradiata* (Seno-o et al., 2008) juveniles fed diets where fish oil was replaced by vegetable oil. Increases in glucose and cortisol levels normally appear as a response to chronic stress in fish. In our study, the addition of probiotics caused an increase in cortisol and a decrease in glucose between groups without FO in diet, therefore probiotics had no stress mitigating effect according to the parameters studied in the blood, results different from those obtained in many studies in which the addition of probiotics reduced the stress of fish (Gabr et al., 2023; Gonçalves et al., 2011; Hoseinifar et al., 2021; Mohapatra et al., 2012; Paray et al., 2020). The lack of differences in these plasma parameters also indicates that the fish were not suffering from stress related to diet.

The results of this study indicate that full substitution of fish oil for vegetable oils does not significantly affect *Seriola dumerili* oxidative stress. The inclusion of a *Lactobacillus* probiotic in diet with complete FO replacement did not have positive effects on oxidative stress, and

no significant differences have been found on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation or hematological parameters.

Capítulo 6:
Alternativas a la harina de pescado y
aceite de pescado, alteraciones en la
salud de la seriola mediterránea
(*Seriola dumerili*)

1. SPECIFIC OBJECTIVES

- Investigate the sustainability of aquaculture by experimenting with varying levels of fishmeal and fish oil substitution in the diet of *S. dumerili* and assess their impact on growth and health status.
- Examine the effects of FM and FO substitution on hepatic and intestinal health using plant-derived meals or animal-derived meals and vegetal oils.
- Investigate the potential effects on the histology of the digestive system of *Seriola dumerili* due to the replacement of fish oil and fishmeal.
- Investigate the alterations in the intestinal microbial composition resulting from the substitution of fishmeal with alternative protein and lipidic sources.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Fish and experimental diets

A total of 360 *S. dumerili* fishes from the Futuna Blue S.A. Company (Cádiz, Spain) were acclimatized for a month to laboratory conditions before starting the trial. Along this time, fish were fed up to apparent satiation, twice daily (9:00 a.m.-16:00 p.m.) with a control diet (Table 6.1), six days a week. Water parameters had been constantly monitored: temperature $21.5 \pm 2.4^{\circ}\text{C}$, salinity $31 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($31.5 \pm 4.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 7.5 to 8.0 and dissolved oxygen $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. after acclimatization period, fish were randomly distributed in 18 tanks (20 fish/tank; (average weight $38.4 \pm 11.6 \text{ g}$). The animals were anaesthetized with clove oil at $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, containing 87% of euglenol (Guinamas, Valencia, Spain) to limited stress during re-distribution. The trial lasts 154 days. The fish were sampled every 28 days to determine growth and survival data.

Tabla 6.1 Formulation and proximate composition of the experimental diets.

	C	FM 66	FM 33	FM0	FO50	FO0
Ingredients (g/Kg)						
Fish meal	525	350	175		525	525
Wheat meal	235	108	43		235	235
Wheat gluten	130	130	140	180	130	130
Corn gluten		100	100	100		
Defatted Krill		120	230	345		
Meat Meal		80	198	250		
Linseed oil					9	18
Palm oil					36	72
Fish oil	90	92	88	95	45	0
L-Methionine			3	5		
L-Lysine Clh			3	5		
^v Multivitamin and minerals mix	20	20	20	20	20	20
Analysed composition (g/kg dry matter)						
Dry matter (DM)	888	888	895	902	894	899
Crude protein (CP)	530	580	604	633	456	461
Crude lipid (CL)	139	142	138	137	133	135
Ash	103	106	121	115	87	87
Calculated values						
^u Energy (kJ/g)	23.8	24.1	23.7	23.8	24.5	24.0

^vMultivitamin and minerals mix (values are g/kg except those in parenthesis): Premix: 25; Choline, 10; DL-a-tocopherol, 5; ascorbic acid, 5; (PO₄)₂Ca₃, 5. Premix composition: retinol acetate, 1000000 IU/kg; calcipherol, 500 IU/kg; DL-a-tocopherol, 10; menadione sodium bisulfite, 0.8; thiamine hydrochloride, 2.3; riboflavin, 2.3; pyridoxine hydrochloride, 15; cyanocobalamin, 25; nicotinamide, 15; pantothenic acid, 6; folic acid, 0.65; biotin, 0.07; ascorbic acid, 75; inositol, 15; betaine, 100; polypeptides 12.

^uEnergy (%) = (51.8 x (%C/100)) – (19.4 x (%N/100)). Calculated according to (Brouwer, 1965)

With the aim to evaluate the effect of fish sources substitution into de diets, five isolipid diets and isoproteic diets were formulated. Diets were formulated with different levels of fishmeal and fish oil substitution by a mixture of animal and vegetable meal and a mixture of vegetable oils. Diets formulation and composition are shown in Table 5. The diet C had fishmeal as the main protein source and fish oil as the main lipid source.

2.2. Chemical analysis

Chemical analyses of the dietary ingredients were performed prior to diet formulation, and after the fabrication to check the final diet composition. Fish diets ingredients composition were analysed according to (AOAC., 1990) procedures: dry matter, official method 934.01 (105°C to constant weight); ash, official method 942.05 (incinerated at 550°C for 5 h); crude protein, official method 990.03 (determined by direct combustion method DUMAS using LECO CN628) and crude lipid, official method 920.39 (extracted with methyl-ether using ANKOMXT10 Extractor) The energy was calculated from the C (g) and N (g) balance ($GE = 51.8 \times C - 19.4 \times N$) according to (Brouwer, 1965). Nitrogen and carbon were analysed by the Dumas principle (TruSpec CN; Leco Corporation, St. Joseph, MI, USA).

2.3. Histological analysis

Samples of proximal and distal intestine from three fish per tank were taken at the end of the experiment, fixed in formalin, dehydrated in a different ethanol concentration and fixed in paraffin. Sections (5 µm) were dyed with PAS-Alcian blue for intestine samples and eosine-hematoxyline for liver samples and observed through light microscopy.

The histological analysis performed was a quantitative analysis. Measurements used a combination of parameters proposed by different authors (Adamidou et al., 2009; Øverland et al., 2009; Santigosa et al., 2008). Specifically, the histological analysis focused on the measurement of length and width of the intestinal villus in proximal and distal intestine and liver. In gut samples, six villi were measured for each of the three fish collected in each of the three tanks belonging to the same treatment. In addition, the thickness of the lamina propria, of the submucosa, muscular and serous layer were analysed. In liver samples, six nucleus and six hepatocyte were measured.

All the images of samples were taken with an optical microscope Nikon JAPON 0.90. The images were analysed using Photoshop software and a conversion into metric units.

2.4. 16S rRNA sequencing and library construction

For metagenomic analysis were included fish (n=7) from those diets with the maximum FO and FM replacement, with best performance: FM33 and FO-0. Genomic DNA (gDNA) extraction was performed from posterior intestinal tract samples, using the commercial house DNeasy[®] Tissue Kit (QIAGEN). The extracted DNA was evaluated for purity and concentration using a NanoDropTM 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Milan, Italy). Samples with optical density (OD) readings falling between 1.6 and 1.9 at 260/280 nm were considered acceptable, and sent to Macrogen (Seoul, South Korea) for 16S rRNA gene-based metagenomic sequencing. Before sequencing, the quantity of DNA was assessed by processing it through vector 3 fluorometry (Waltham, MA, USA) with the use of DNA binding dye (Invitrogen, cat. #P7589), having a final number of 6 individuals per group.

The 16S rRNA gene amplicon libraries were generated following the Illumina system protocol "16S Metagenomic Sequencing Library Preparation". First, following the protocol, PCR - targeting the V3-V4 variable regions of 16S rDNA - was performed using the high fidelity enzyme Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Italy) and the universal primers Pro341F (5'-CCTACGGGNBGCASCAG-3') and Pro805R (5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3') described by (Takahashi et al., 2014). Subsequently, to verify the amplicon size, the samples were run on an Agilent 2100 Bioanalyzer, with the expected size being approximately 550 bp. For the preparation and sequencing of the library, the protocol described by Rimoldi et al. (2018) was followed. Briefly, using a kit the PCR products are purified, using Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter Genomics, Italy) for this purpose. Next, using the Herculanase II Fusion DNA polymerase Nextera XT Index Kit V2 (Illumina, San Diego, CA, USA) the Illumina sequencing adapters (P5 and P7) and dual index are ligated to the purified amplicons.

The libraries were then purified and the final size of the amplicons was verified using the AMPure XP beads purification system (Beckman Coulter Genomics, Italy) and Agilent 2200 TapeStation bioanalyzer

(Agilent Technologies, Italy). The expected size of the library was approximately 630 bp. Prior to sequencing, libraries were quantified by quantitative PCR (qPCR) using the KAPA Library Quantification Kits for Illumina® platforms (Kapa Biosystems Ltd, UK). Finally, libraries pooled in equimolar concentrations are multiplexed and sequenced following the 2x300 bp paired-end protocol of the Illumina HiSeq X Ten platform (Illumina, San Diego, CA, USA).

Out of the 15 selected samples (5 from each group), 14 successfully passed the library quality control (QC) assessment. However, one sample from the control group did not meet the QC criteria and was rejected.

2.5. Bioinformatics analysis

The quality of reads was assessed after sequencing of amplicons with FastQC software v.0.11.9 and Qiime2 software v.2021.4 I tools. Trimming and filtering for quality was performed with the q2-demux add-on and subsequent denoising with DADA2, via q2-dada2 (Callahan et al., 2016). Amplicon Sequence Variants (ASVs) were aligned with mafft via q2-alignment (Katoh et al., 2002) and subsequently used to construct phylogeny with fasttree2 via q2-phylogeny (Price et al., 2010). Taxonomy was assigned to ASVs using the q2 classify-sklearn feature classifier (Bokulich et al., 2018) with the Naive Bayes taxonomy classifier itself trained against the Silva 139_99% to 16S V3-V4 region reference sequences (Klindworth et al., 2013). Based on the number of assigned reads, the relative abundances (%) of taxa in each gut microbiota sample were calculated.

In addition, the diversity between serials fed the same experimental diets was evaluated, as well as the variability existing between diets C, FM33 and F00. For this purpose, alpha diversity indexes were determined, which evaluate taxonomic richness and abundance, Shannon index, Chao1 index, Evenness index, Simpson index, Berger Parker index. Alpha rarefaction curve, Observed features (number of observed taxa) and Faith's Phylogenetic diversity index have also been determined. On the other hand, the differences between samples of both groups have been analyzed by beta diversity. For this purpose,

UniFrac, Unweighted UniFrac (presence/absence matrix) and Weighted UniFrac (presence/absence/abundance matrix) analyses were performed, from which Principal Coordinate Analysis (PCoA) plots of three dimensions were constructed. All diversity indices were obtained using Qiime2 software v.2021.4 (Bokulich et al., 2018).

2.6. Statistical analysis

Growth data and histological analysis were treated using multifactor analysis of variance (ANOVA). The Newman–Keuls test was used to assess specific differences among diets at 0.05 significant levels (Statgraphics, Statistical Graphics System, Version Centurion XVI, Warrenton, Virginia, USA).

3. RESULTS

3.1. Growth data

For 154 days of trial, no negative effects were found neither partial nor complete fish oil substitution (Figure 6.1) lower values were observed in fish fed with FM0 diet but without statistical differences.

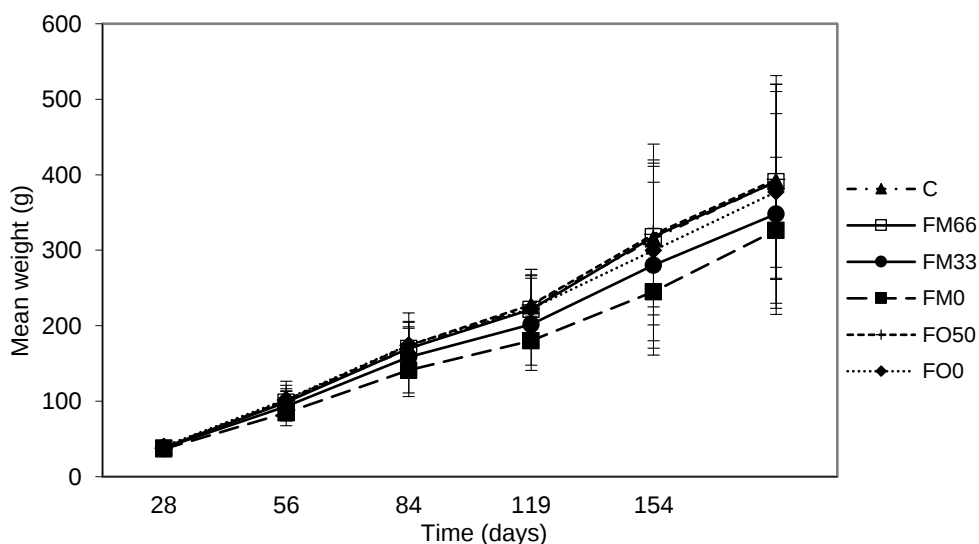


Figura 6.1 Mean weight evolution of fish per treatment along the growth trial.

A complete fishmeal substitution also affected the survival at the end of the trial, with lower percentage ($22.8 \pm 13\%$) respect control and other experimental diets (Figure 6.2).

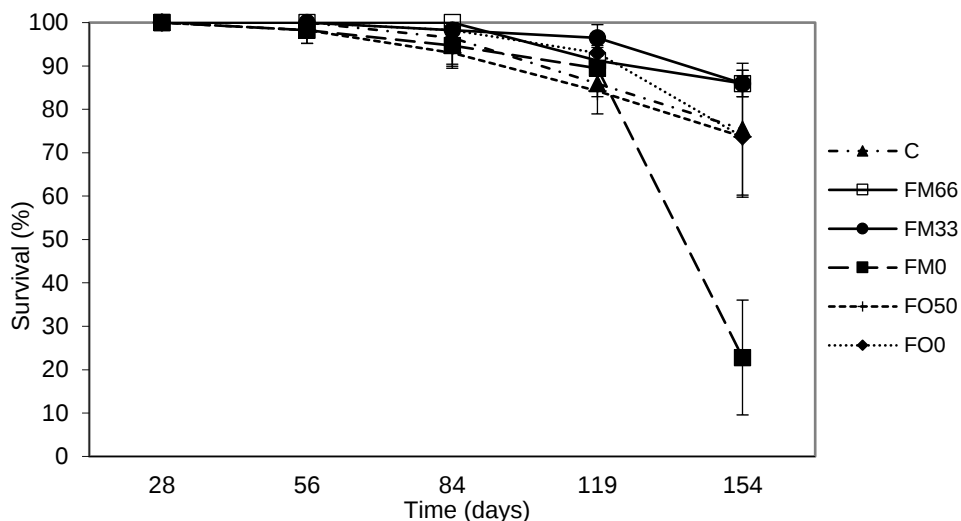


Figura 6.2 Survival per treatment during through the growth trial. Asterisk indicates significant differences between treatments ($p < 0.05$).

3.2. Histological analysis

At anterior intestine level, fishmeal replacement reduced the length and width of the villi, and the thickness of muscular layer (Table 1). At posterior level, wider and narrower lamina propria and muscle layer, respectively, were registered in the experimental groups with higher fishmeal substitution (Table 6.2 and Figure 6.3).

Table 6.2 Histological measurements of the anterior and posterior intestine in fish fed the experimental diets (FM replacement) at the end of the growth trial.

	C	FM66	FM33	FM0
<i>Anterior intestine</i>				
SL (μm)	48 ± 4	43 ± 4	52 ± 4	58 ± 4
ML (μm)	$147^b \pm 10$	$109^a \pm 9$	$140^b \pm 10$	$165^b \pm 10$
SML (μm)	83 ± 5^b	63 ± 4^a	73 ± 5^{ab}	69 ± 5^{ab}
VL (μm)	661 ± 46^a	467 ± 46^b	507 ± 47^b	430 ± 44^b

WVL (μm)	64 ± 4^a	61 ± 4^{ab}	57 ± 4^{ab}	48 ± 4^b
WLP (μm)	15.6 ± 1.3	16.3 ± 1.3	15.9 ± 1.3	15.3 ± 1.2
GC	60 ± 5	47 ± 5	53 ± 5	47 ± 5
Posterior intestine				
SL (μm)	48 ± 4	48 ± 4	58 ± 5	56 ± 4
ML (μm)	$117^{ab} \pm 8$	$113^a \pm 8$	$147^b \pm 10$	$148^b \pm 9$
SML (μm)	67 ± 4	64 ± 4	77 ± 5	60 ± 5
VL (μm)	510 ± 37	594 ± 29	525 ± 54	494 ± 39
WVL (μm)	60 ± 3	63 ± 2	55 ± 4	62 ± 3
WLP (μm)	$11.1^a \pm 1,2$	$11.1^a \pm 1,7$	$15.5^a \pm 1,1$	$19.8^b \pm 1,3$
GC	43 ± 4	49 ± 3	42 ± 6	51 ± 4

The values represent the mean $\pm$ standard error (n= 18). Different superscripts letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$). SL: Thickness of serosa layer, ML: Thickness of muscular layer, SML: Thickness of submucosa layer, VL: Villus length, WVL: Width villi, WLP: Width of *lamina propria*, GC: Globet cell

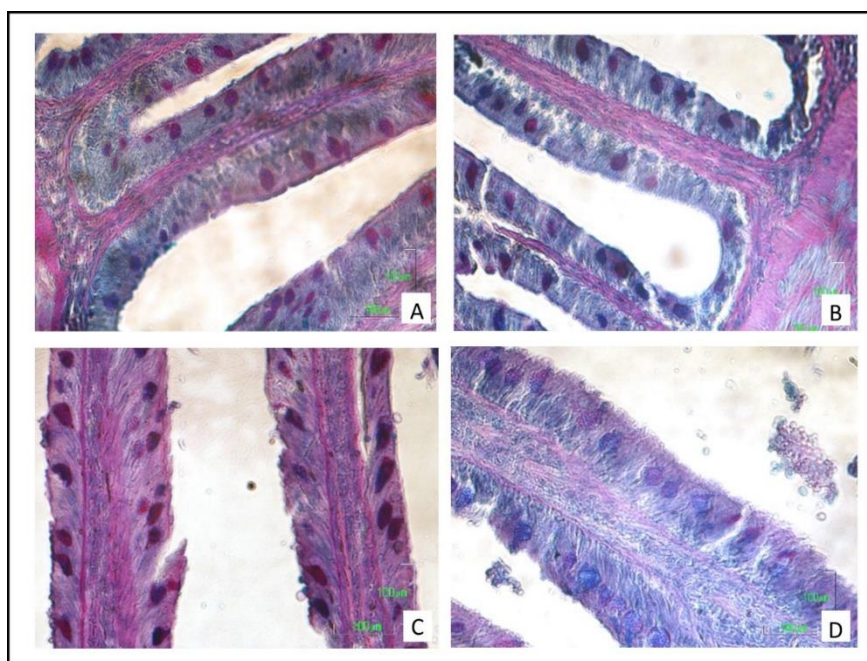


Figure 6.3 Microphotographs of posterior intestine section (a) C (20 $\times$). (b) FM66 (20 $\times$). (c) FM33 (20 $\times$). (d) FM0 (20 $\times$) of yellowtail. Haematoxylin and eosine staining.

Regarding liver histology, FM replacement decreased the diameter of the hepatocyte (Table 6.3 and Figure 6.4).

Table 6.3 Histological measurements of liver in fish fed the experimental diets (FM replacement) at the end of the growth trial.

	C	FM66	FM33	FM0
Nuclei diameter (μm)	59 ± 1	61 ± 1	57 ± 1	62 ± 2
Hepatocyte diameter(μm)	$152^a \pm 3$	$148^a \pm 3$	$141^{ab} \pm 4$	$130^b \pm 6$

The values represent the mean $\pm$ standard error (n=54). Different superscripts letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

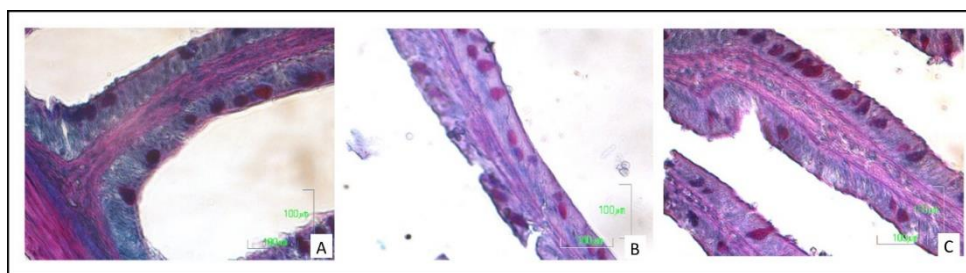


Figure 6.4 Microphotographs of posterior intestine section (a) C (20 $\times$) (b) FO50 (20 $\times$) (c) FO0 (20 $\times$) of yellowtail. Haematoxylin and eosine staining.

On the other hand, at anterior level, FO replacement affected the width of lamina propria, but without a clear effect, with lower values in FO50 and higher in FO0 group (Table 6.3). Nevertheless, at posterior level, the substitution induced a clear reduction of the width of lamina propria (Table 6.4 and Figure 6.5). At posterior level, were also found differences in the width villi, but again without a clear effect in relation to FO substitution.

Table 6.4 Histological measurements of the anterior and posterior intestine in fish fed the experimental diets (FO replacement) at the end of the growth trial.

	C	FO50	FO0
<i>Anterior intestine</i>			
SL (μm)	48 ± 4	55 ± 4	55 ± 4
ML (μm)	147 ± 10	151 ± 9	174 ± 10
SML (μm)	83 ± 5	84 ± 4	88 ± 5
VL (μm)	661 ± 45	541 ± 51	542 ± 61
WVL (μm)	64 ± 4	50 ± 5	65 ± 6

WLP (μm)	$15.6^{ab} \pm 1.4$	$12.3^a \pm 1.6$	$18.3^b \pm 1.9$
GC	60 ± 5	48 ± 5	48 ± 7
Posterior intestine			
SL (μm)	48 ± 4	45 ± 4	47 ± 4
ML (μm)	117 ± 8	128 ± 8	134 ± 8
SML (μm)	67 ± 4	65 ± 4	69 ± 4
VL (μm)	510 ± 37	433 ± 35	498 ± 49
WVL (μm)	$60^{ab} \pm 3$	$51^a \pm 3$	$64^b \pm 4$
WLP (μm)	$11.1^a \pm 1.2$	$10.4^a \pm 1.2$	$15.3^b \pm 1.7$
GC	43 ± 4	33 ± 4	42 ± 5

The values represent the mean $\pm$ standard error ($n=18$). Different superscripts letters indicate significant differences between treatments ($p<0.05$). Test de Newman-Keuls. SL: Thickness of serosa layer, ML: Thickness of muscular layer, SML: Thickness of submucosa layer, VL: Villus length, WVL: Width villi, WLP: Width of lamina propria, GC: Globet cell.

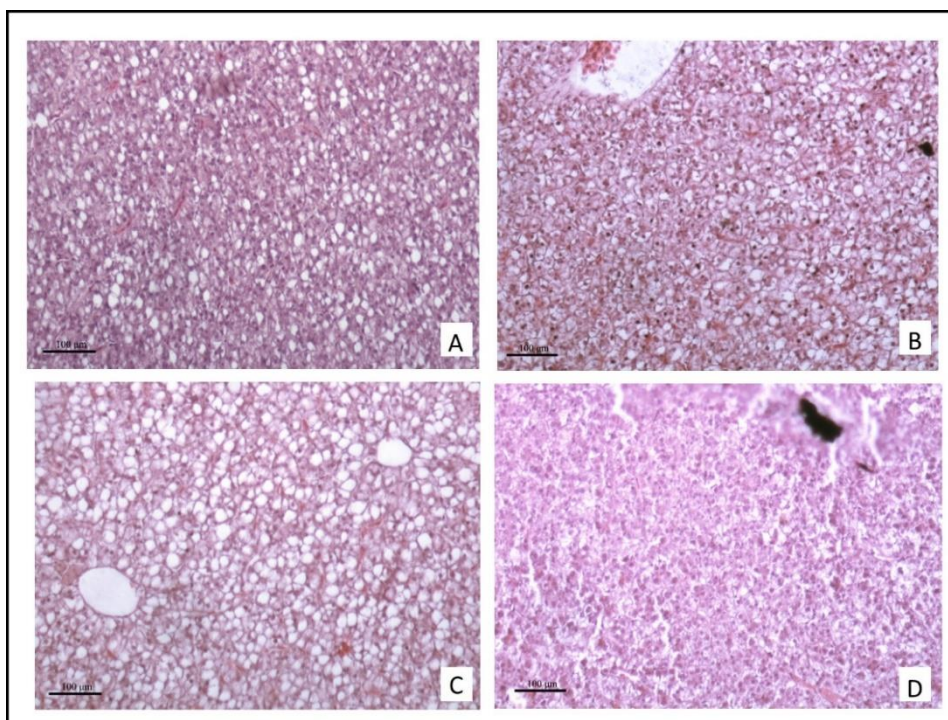


Figure 6.5 Microphotographs of liver section (a) C (20 $\times$). (b) FM66 (20 $\times$). (c) FM33 (20 $\times$). (d) FM0 (20 $\times$) of yellowtail. Haematoxylin and eosine staining.

At liver level, FO substitution did not affect the diameter of hepatocyte, instead a reduction of nuclei was observed respect to control diets (Table 6.5 and Figure 6.6).

Table 6.5 Histological measurements of the liver in fish fed the experimental diets (FO replacement) at the end of the growth trial.

	C	FO50	FO0
Nuclei diameter (μm)	$59^a \pm 1$	$54^b \pm 1$	$56^{ab} \pm 2$
Hepatocyte diameter (μm)	$152^a \pm 3$	$133^b \pm 3$	$142^b \pm 4$

The values represent the mean $\pm$ standard error (n=54). Different superscripts letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$). Test de Newman-Keuls.

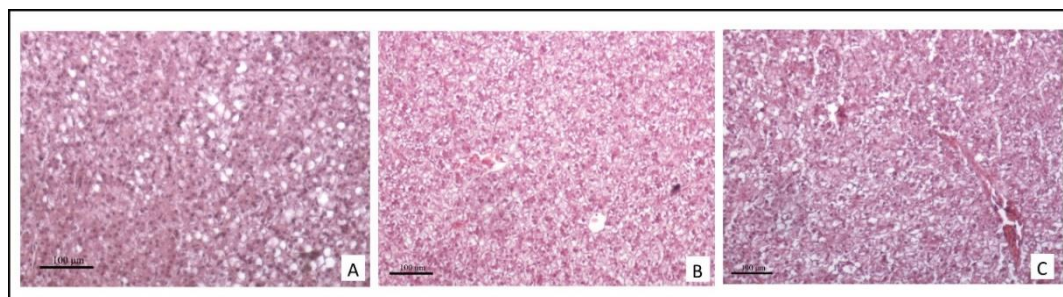


Figure 6.6 Microphotographs of liver section (a) C (20 $\times$) (b) FO50 (20 $\times$) (c) FO0 (20 $\times$) of yellowtail. Haematoxylin and eosine staining.

3.3. Gut microbiota

After quality filtering, a total of 1,028,047 reads were obtained, with reads per sample ranging from 41,952-63,319. The mean of the percentage of non-chimeric merged sequences were $82.37 \pm 3.05\%$. A total of 17 phyla and 34 genera were identified. From the 17 phyla identified in *Seriola dumerili* intestinal gut, more than 94% of operational taxonomic units belonged to six of them. The most abundant phyla ($\geq 5\%$) common to all fish analyzed were *Spirochaetes*, *Proteobacteria* and *Actinobacteria*.

Based on the diet, we registered slight differences (Figure 6.7). Control diet fish were dominated by phylum *Proteobacteria* ($57 \pm 13.3\%$), followed by *Spirochaetes* ($16 \pm 12.1\%$) and *Bacteroidetes* ($10 \pm 4.5\%$). Within the phylum *Proteobacteria*, the most numerous genera were:

Legionella (7.1%), *Rhodobacterium* (4.9 %) and *Sphingomona* (3%). The *Brevinema spp.* (15.6 %) of the phylum *Spirochaetota* also stands out.

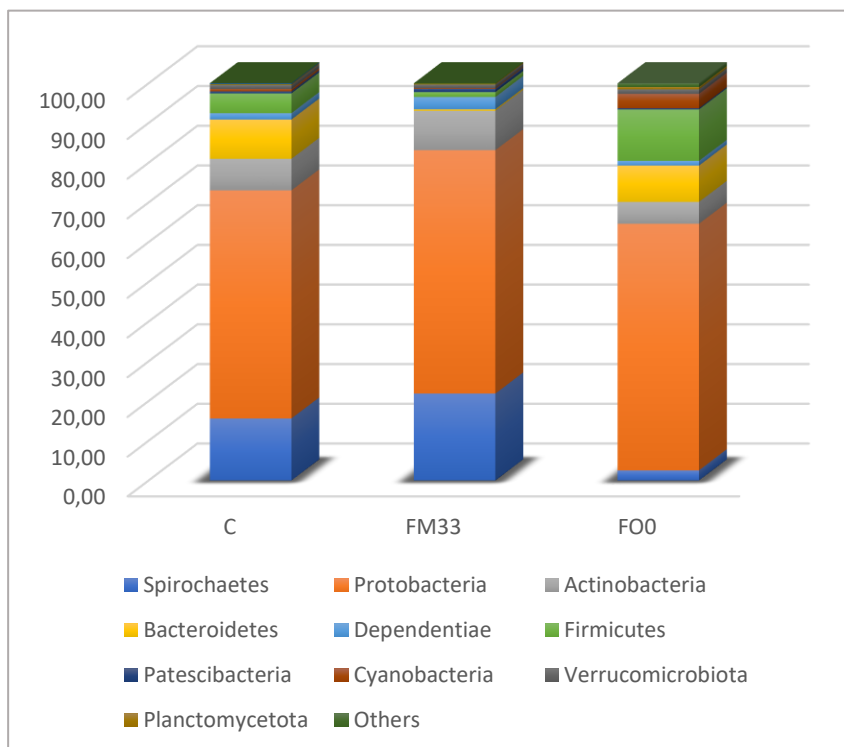


Figura 6.7 16S OUT Relative abundance (%) of the main taxa at the phylum level present in control diet (C), the FM substitute diet (FM33) and FO replacement (FO0).

Other genera with less representation are *Corynebacterium* (1.8%); *Staphylococcus* (1.75 %) and *Mycobacterium* (1.4%).

FM33 diet showed a similar dominance: *Proteobacteria* ($61 \pm 12\%$) followed by *Spirochaetes* ($22 \pm 12\%$), but the third most abundant was *Actinobacteria* ($10 \pm 5.8\%$). At genus level, the highest representation corresponds to *Brevinema* (21.9%), followed by *Legionella* (6.75%), *Vibrio* (6%), *Rhodobacterium* (4.3 %), *Marivita* (3.9%) *Sphingomona* (2.4%). The *Mycobacterium spp.* from *Actinobacteriota* phylum also has an important presence (9.4%).

If FO was totally replaced (FO0), the intestinal microbiote was also dominated by *Proteobacteria* ($62\% \pm 13.3$), standing out the genera: *Rhodobacterium* (7.3%), *Sphingomona* (5.2%), *Legionella* (2.5%), *Photobacterium* (3.4%). *Firmicutes* was represented by a $13\% \pm 1.5$ and *Bacteroidetes* by a $9\% \pm 5.1$. In the phylum *Firmicutes* the genera *Staphylococcus* (3.6%) and *Thermicanus* (2%) were also abundant. Other genera with lower representation are *Brevinema* (2.6%), *Mycobacterium* (1.4%), *Atopobium* (1.6%) and *Lactobacillus* (2.6%).

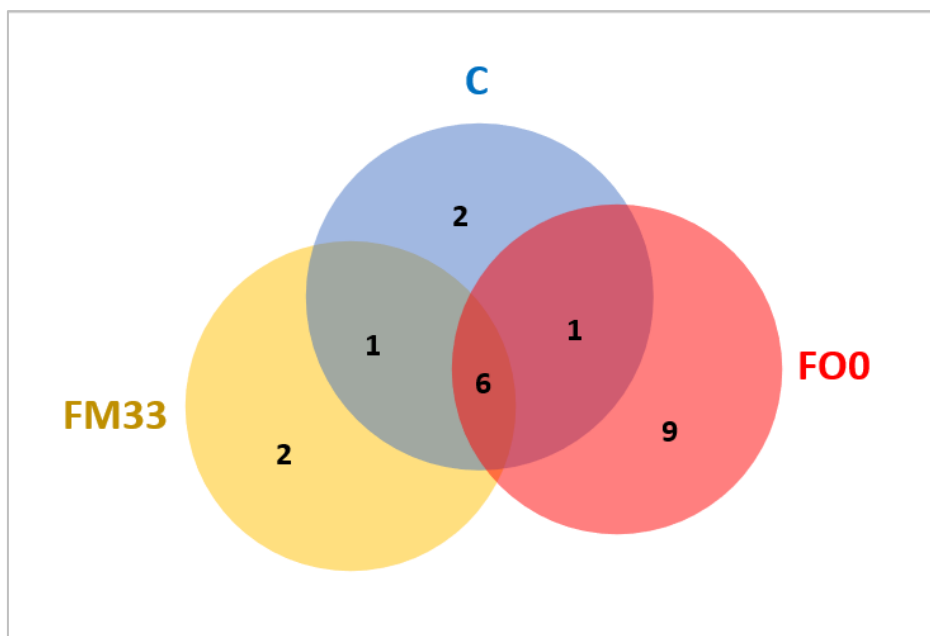


Figure 6.8 Venn diagrams at genus taxonomic level. OTUs included were present in percentages above 1%. Common bacterial genus are displayed in the middle regions and specific bacterial families of fish fed the C, FM33 and the FO0 diet are displayed in blue, orange and red colour.

Significant differences were found for *Cyanobacteria*, with lower values in the fish fed FM33. Although no significant differences were found in the rest of the phylum, perhaps due to the high intra-group variability, with FM replacement the phyla *Bacteroidetes* and *Firmicutes* show a downward trend, while the phyla *actinobacteria*, *proteobacteria*, *spirochaetes* and *dependentiae* have a tendency to increase. When FO is substituted, the relative abundance of

spirochaetes and actinobacteria tends to decrease and firmicutes and cyanobacteria to increase. In the case of the analysis of bacteria at the genus level, no differences were found, quite possibly the same as at the phylum level due to the variability in the groups.

Thanks to Venn diagram, a broader perspective is shown (Figure 6.3). A core of 6 bacterial genus was shared by three experimental groups. Only a genus is common between FM33 and control diet (*Babeliaceae*), and other between control and F00 diets (*Staphylococcus*). A greater number of genus specifically associated with de diet F00 were found. *Photobacterium*, *Enhydrobacter*, *Thermicanus* *Atopobium*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Neisseria* and *Muribaculaceae* genus were exclusive of F00, while *Cloacibacterium* and *Corynebacterium* were only observed in fish fed C and *Marivita* and *Babeliae* in FM33. Finally, significant differences in α -diversity were found between FM33 and F00, but not with control group (FM100). Fish fed F00 diet had not only a higher number of taxa observed than FM33 (Figure 6.4, A) but also a major species richness using Chao1 (Figure 6.4, B) and Shannon (Figure 6.4, C) indices. On the other hand, surprisingly, control diet presented middle values, without differences neither F00 nor FM33. β -diversity was visualised using a PCoA Unweighted Unifrac distance plot and significant separation of the gut microbial compositions by treatment was found (Figure 6.5). The samples from the F00 diet were grouped and separated from the FM33 samples.

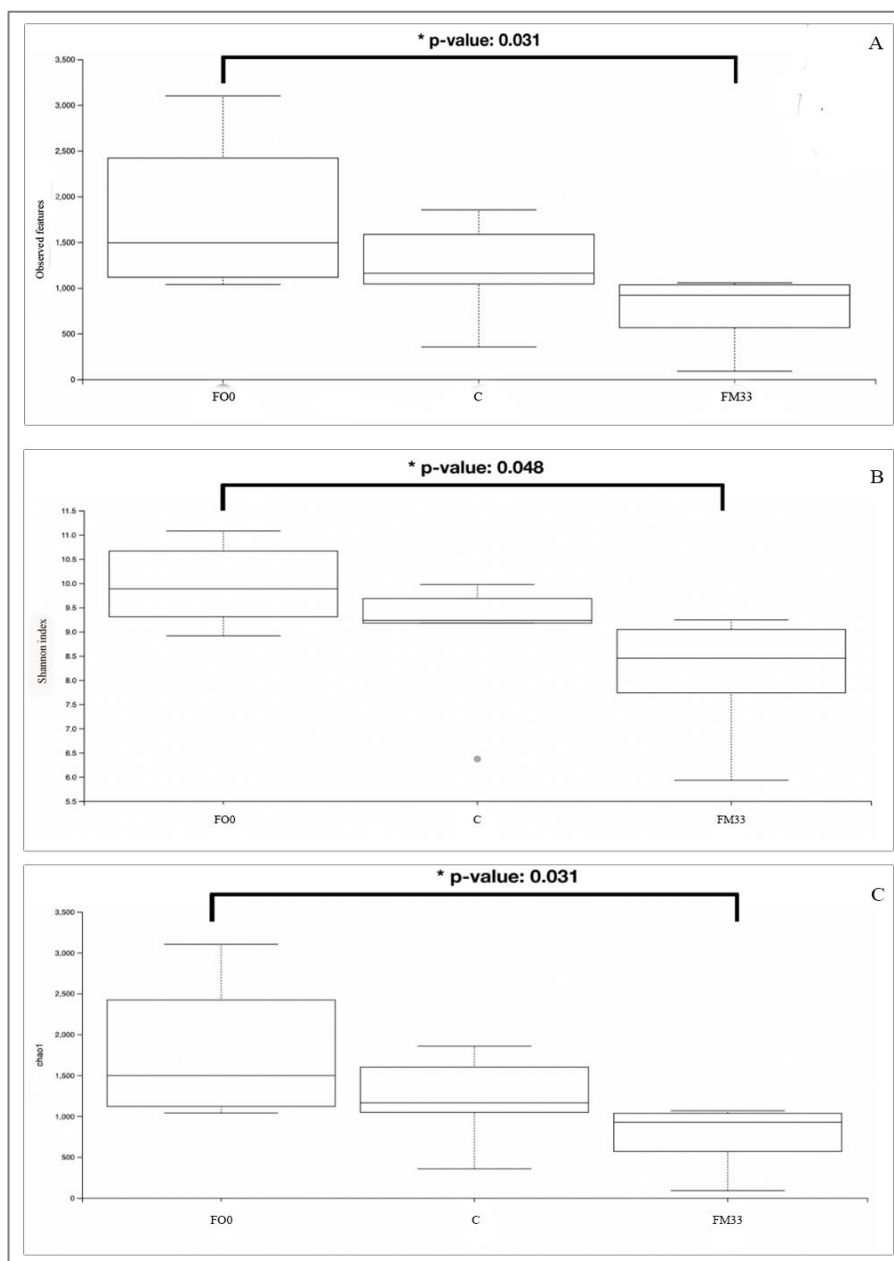


Figure 6.9 α -Diversity measures; (A) Observed features, (B) Shannon index and (C) Chao1 index, of 16S microbiota gut community compositions of experimental groups control diet (C), the FM substitute diet (FM33) and FO replacement (FO0).

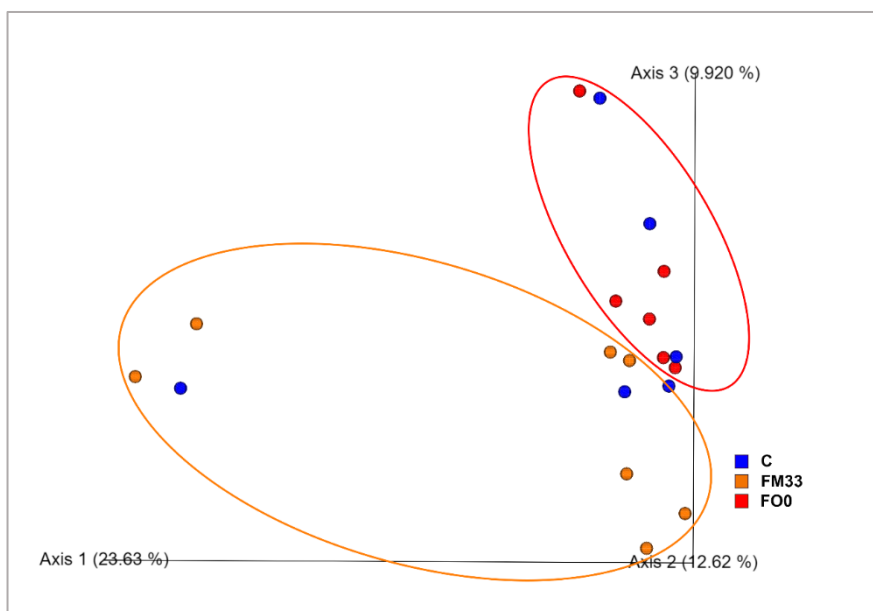


Figure 6.10 PCoA Unweighted Unifrac distance of the microbiota of experimental groups control diet (C), the FM substitute diet (FM33) and FO replacement (FO0). The first, second and third principal component explained 46% of the sample variations.

4. DISCUSSION

Attending to the results, it could be confirmed that a high fishmeal and total fish oil substitution by a mix of alternative vegetal and animal sources is possible without affecting the growth and health in *S. dumerili*. Nevertheless, a total fishmeal substitution reported higher mortality. Previous work with total FM substitution registered similar results, likely, as consequence of antinutrients presence into plant protein sources. It has been reported that antinutrients may cause immune depression events (Francis et al., 2001) and nutrient deficiencies (Spinelli et al., 1983), leading to a deterioration of intestinal health, increasing the susceptibility to pathogens, and finally to the death (Estruch et al., 2015; Sitjà-Bobadilla et al., 2005). These results are in discordance with previous studies in juvenile *Seriola dumerili*, when soybean was used to replace FM up to 50% and lower growth were obtained but without survival affection (Dawood et al.,

2015; Tomás-Vidal et al., 2005), in this trial the FM replacement affected survival and no affected growth.

As have been described, the poor results obtained with a total FM substitution may be due to the fact that plant protein sources induce an intestinal inflammation (Aragão et al., 2022; Krogdahl et al., 2010). This inflammatory response is characterized in salmonids by a shortening of mucosal folds and a widening of lamina propria (Øverland et al., 2009), due to the infiltration of inflammatory cells identified as lymphocytes, macrophages, eosinophils and cells, granular neutrophils, and diffuse immunoglobulin M (IgM) (Krogdahl et al., 2000). However, the inclusion of plant protein sources does not produce such striking alterations in other species as sea bream (Baeza-Ariño et al., 2016), and no information about the effect on Mediterranean yellowtail, but it has been shown that high FM replacement (75%) can cause a decrease in enterocytes and villi size at intestine level (Hossain et al., 2018). In the present work, the results showed significant differences in the length of the villi between the different diets, mainly at anterior intestine, but it cannot be stated that the surface has been reduced with the substitution since it also depends on the number of villi. Contrary to was observed in perch (Zhou et al., 2020) and turbot (Gu et al., 2016), in which differences were found in the posterior intestine with a shortening of villi when FM was substituted by soybean and poultry by-product meal. In posterior intestine, a thickness increase of lamina propia (LP) was observed with FM substitution, in fact FMO group registered the thickest LP, close to enteritis symptom. Similar results were reported in turbot, where the replacement of fishmeal caused enteritis in posterior intestine (Gu et al., 2016). FO substitution also induced LP differences in both anterior and posterior intestine, registering major values. In previous studies, similar data were observed in this species (Milián-Sorribes et al., 2020), likely caused by inflammatory process, since the LP width used to be related to the cell number that forms it and the level of eosinophilic cell infiltration.

An inadequate diet can cause hepatocyte vacuolization, fat degeneration, metabolic changes or necrosis (Feist, 2009; Nagel et al.,

2012). The alterations found can be different depending on whether the replacement is proteinic or lipidic. Smaller hepatocyte diameter was observed with FM substitution in the current work, which is a hallmark of hepatic apoptosis, usually considered an indicator of unbalanced nutrition (Aragão et al., 2022). Similar results were obtained in *Ameiurus nebulosus* (Matulić et al., 2020) and *Sparus aurata* (Caballero et al., 1999), where a complete FM replacement led to the appearance of inflammatory signs and irregular hepatocytes with smaller nuclei.

In the current work, FO substitution caused a decrease in the hepatocyte size and nuclei, what is also considered as indicator of fish malnutrition. In fish fed with vegetable oils, similar results were found in gilthead sea bream (Caballero et al., 2004) or in Japanese seabass (Xu et al., 2016) when a 60% of FO replacement resulted in steatosis and appearance of vacuoles into the hepatocyte. A higher hepatocyte size by leukocyte infiltration and a reduction of its nuclei have been also reported as indicators of liver damage, possibly due to the presence of anti-nutritive substances in the diet (Caballero et al., 2004). If we attend to the visual aspect of liver after FM substitution (Figure S9), a significant presence of fat can be observed especially in the fish fed with the control feed respect to experimental diets. The low number of vacuoles may be related to lower enzyme activity (Caballero et al., 2004).

Microbial communities are also a tool to evaluate intestinal health status (Nayak, 2010). In fact, an association has been established between a high richness and relative abundance in the gastrointestinal tract with good metabolic capacity and animal welfare (Soriano et al., 2018). A substitution of traditional protein sources by alternative plant or animal sources ought not to cause a negative effect on gut microbial communities (Desai et al., 2012). In fact, a moderate fishmeal substitution did not report a significant effect on microbiota diversity and composition in sea bream (Dimitroglou et al., 2010), however, higher or complete substitutions of FM can affect the immune system (Sitjà-Bobadilla et al., 2005), causing inflammatory secretions (Hetland et al., 2010) or enteropathy (Hedrer et al., 2013). As far as is known,

no studies have been conducted to date on the influence of fish oil and fish meal substitution on gut microbiota of *Seriola dumerili*.

In the current work, the experimental groups with the highest FO and FM substitution with no significant differences in terms of growth and survival respect to control group were chosen to evaluate their microbiota, with the aim to confirm that no relevant alterations have been induced by the fish sources replacement.

Regardless of diet, in the current study, the dominant phylum was *Proteobacteria*, as in other species: salmon (Lavoie et al., 2018), seabream (Estruch et al., 2015; Piazzon et al., 2020), carp (*Cyprinus carpio*) (Eichmiller et al., 2016) or trout (Desai et al., 2012). In previous studies in *Seriola lalandi*, farmed fish registered as dominant phylum *Firmicutes*, meanwhile in wild fish was *Proteobacteria* (Ramírez et al., 2020; Ramírez & Romero, 2017). In fact, *Proteobacteria* is usually the dominant phylum in animals of non-herbivorous trophic levels (Egerton et al., 2018). In control diet, the most relevant classes were *Gammaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria*, relevant for adaptation to environment changes (Salas-Leiva et al., 2020). In particular, *Gammaproteobacteria* are key in animal nutrition and maintenance of other beneficial bacteria (Aguilera et al., 2013). On the other hand, the *Photobacterium* spp. of the *Vibrionaceae* family was overrepresented in mediterranean yellowtail after fish oil replacement, in the current work, *Photobacterium* was only found with representative amount in FO0. These genera have been also associated with fish welfare, as a result of a mutualistic relationship with their host for chitin digestion, but also in some cases with pathogens and producers of enzymes such as neuraminidases that can cause tissue damage (Itoi et al., 2006; Romalde, 2002). Other abundant phyla identified in control diet have been *Bacteroidota*, *Actinobacteriota* and *Firmicutes*, coinciding with those reported in *S. rivoliana* (Salas-Leiva et al., 2020) and *S. lalandi* (Dam et al., 2020; Ramírez & Romero, 2017). The latter two are phyla related to carbohydrate and polysaccharide metabolism (Lau et al., 2022; M. Zhang et al., 2014). However, when dietary fishmeal is substituted, the abundance of *Actinobacteria* increases, especially the *Mycobacterium* spp., which could be due to

the fact that dietary needs have not been adequately met, being known its role as a producer of secondary metabolites in the gut (Aguilera et al., 2013). Nevertheless, the opposite case occurs in FO substitution in which the presence of *Actinobacteriota* decreased although the genus *Atopobium* is only found in fish fed without FO, *Atopobium spp.* has the ability to cause periodontitis, vaginitis, urethritis, as well as bacteremia and sepsis (Evdokimova & Chernenkaya, 2018). Furthermore, the presence of the class *Ruminococcaceae* in fishes fed FM33 and FO0 may be related to the production of butyrate from non-digestible complex polysaccharides, which is known to benefit host physiology, improving the ability to obtain energy from the diet, reinforcing the intestinal epithelial barrier and modulating immune function (Parma et al., 2020). When fishmeal was replaced, high relative abundance of *Brevinema spp.* was observed, decreasing considerably in fish fed without FO. Although some species are known to cause disease in vertebrates, they are also known as endosymbionts, participating in lignocellulose digestion and nitrogen fixation in termites (Kudo, 2009). In addition, enrichment of *Brevinema* and other species of the family *Spirochaetaceae* in salmon has recently been linked to the expression of genes involved in immune response and distal gut barrier function (Li et al., 2021). Similarly, bacteria of phylum *Spirochaetes* are involved in the fermentation of carbohydrates, transporting non-digestible sugars across their cell membranes (Lyons et al., 2017). In fish fed with high levels of dietary fish oil, the abundance of the *Bacilli* class, which dominates the phylum *Firmicutes*, is notable. Although there are species that might cause disease, *Bacillus spp* is being used to improve water quality (Hlodzi et al., 2020) or as probiotics to improve growth and immune status (Abarike et al., 2018; Amoah et al., 2019; Hoseinifar et al., 2021; Yang et al., 2019). On the other hand, the increase in cyanobacteria in fish fed FO0, significantly higher than FM33, may be relevant since it has been demonstrated to produce metabolites that alter nutrient uptake (Nie et al., 2023).

According to α and β -diversity analysis, a clear separation among FO0 and FM33 group, meanwhile control diet registered a middle value, without significant differences with FM33 and FO0. Like in the present

work, in *Seriola lalandi* or in gilthead sea bream, a minor diversity was reported after FM substitution by plant as animal-protein source (Dam et al., 2020)(Moutinho et al., 2017). Similar results can be also found in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) using algae meal (Z. Zhang et al., 2022) or Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using rice protein concentrate (Reda et al., 2022). However, in salmon, a complete of FO substitution did not alter the intestinal bacterial population using a mix of rapeseed, linseed and palm oils (Nikouli et al., 2021). In Nile tilapia, algae oil inclusion neither affect alpha microbiome diversity (Trevi et al., 2023). In the current study, no differences were found respect to control diet, but yes in those fish fed with high fishmeal substitution, what is in concordance with previous studies detailed above.

In summary, it can be concluded that a total FO and high FM substitution is possible without affecting the growth performance, and no relevant effect on animal welfare. Nevertheless, the studies should continue in order to find more sustainable raw materials to include into the diets, without affecting growth performance and intestinal health.

Capítulo 7:

DISCUSIÓN GENERAL

1. Sustitución de AP

En esta tesis doctoral se realizaron tres estudios de los que el aceite de pescado fue sustituido en pienso de la *Seriola dumerili* (Capítulos 3, 4 y 5). En los que se utilizaron diferentes técnicas para evaluar los efectos de dicha sustitución en el crecimiento y la salud de los peces; histología, tanto intestinal como hepática, microbiota intestinal, estrés oxidativo y composición corporal (especialmente ácidos grasos). (Figura 7.1).

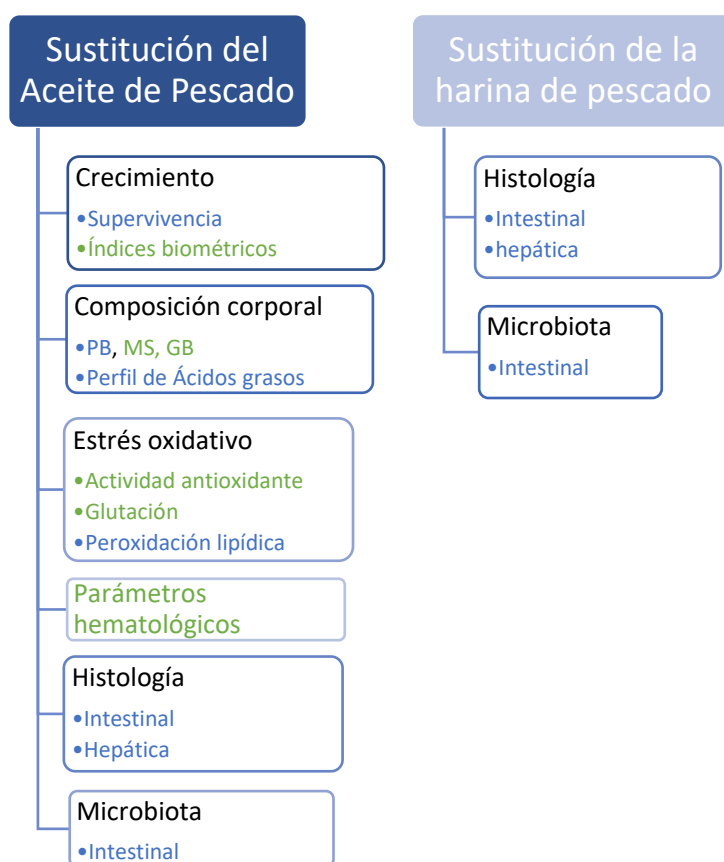


Figura 7.1 Esquema de los análisis realizados durante la tesis doctoral. En color azul aquellos análisis que han detectado diferencias entre dietas y en color verde aquellos que no detectaron diferencias.

La sustitución de aceite de pescado por mezclas de aceites vegetales no tuvo efectos significativos en el crecimiento ni en los parámetros nutricionales de la *Seriola mediterránea*. Sin embargo, esta sustitución tuvo un efecto negativo en la supervivencia, posiblemente debido a la deficiencia de ácidos grasos esenciales en las dietas sin aceite de pescado, lo que podría llevar a la inmunosupresión en dorada y lubina japonesa (Montero et al., 1998, 2003; Xu et al., 2010). La sustitución de más del 75% de AP por mezclas de aceites vegetales afectó significativamente la supervivencia de la seriola.

La relación entre el nivel de ácidos grasos en la dieta y la supervivencia de los peces fue observada en este estudio. La falta de EPA y DHA puede debilitar el sistema inmunológico. Además, los ácidos grasos dietéticos pueden influir en la composición lipídica de las membranas celulares y en la respuesta inmunológica en trucha arcoíris y cobia (Kiron et al., 1995; Salze et al., 2010). Los niveles de HUFA n-3 se redujeron drásticamente a 0,28% y 0,45% para EPA y DHA, respectivamente, con la sustitución del aceite de pescado en las dietas. Solo las dietas control y sustitución de hasta el 75% del AP parecían cubrir las necesidades de HUFA n-3 de esta especie. Curiosamente, el primer indicio de una deficiencia de HUFA n-3 suficiente en la dieta fue un aumento en la mortalidad en lugar de una reducción en el crecimiento, como se observó en otros estudios (Bell et al., 1999; Glencross, 2009). Aunque los ácidos grasos dietéticos pueden afectar la producción de eicosanoides derivados de ácidos grasos de 20 carbonos, como EPA y ácido araquidónico, los resultados sugirieron que la falta de equilibrio en la contribución de ácidos grasos podría cambiar la composición de ácidos grasos de las células inmunológicas y su respuesta inmunológica (Montero et al., 2008).

En estudios previos en peces, se observó una mejora en las defensas antioxidantes al aumentar el nivel de ácidos grasos marinos en la dieta de la dorada (Magalhães et al., 2022). Los niveles de n-3 HUFA influyeron en la capacidad antioxidante de juveniles de dorada de cabeza negra (*Acanthopagrus schlegelii*). Un aumento de los niveles de n-3 HUFA en la dieta se asocia con un aumento en el contenido de MDA en el hígado y suero (Jin et al., 2017). Por otro lado, la sustitución del

aceite de pescado por aceites vegetales podría haber afectado negativamente la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo, lo que podría llevar a un deterioro de la función de la membrana y la reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas en tilapia (Peng et al., 2016). Existen varios trabajos en los que se ha observado un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes como SOD y CAT a medida que aumenta la sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales en la dieta en *Nibeia coibor* y trucha arcoíris (Huang et al., 2016; Khezrian et al., 2020). Además, la actividad de CAT hepática mostró una relación negativa con la sustitución de aceite de pescado en la dieta.

No obstante, en la presente tesis doctoral, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros de estrés oxidativo a pesar de las diferencias en los ácidos grasos marinos en las dietas, aunque sí que se apreció una tendencia a disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes a medida que aumentaba la sustitución del aceite de pescado, especialmente en la G6PD, importante en la producción de NADPH necesario para la biosíntesis reductora, la renovación de glutatión reducido (GSH) y la detoxificación en las células en pees híbridos (Tan et al., 2018).

Los resultados del presente estudio mostraron que, excepto por el colesterol, la composición de la dieta no afectó a los parámetros sanguíneos. Se observó que los niveles de colesterol disminuyeron con la mayor inclusión de aceites vegetales en la dieta, lo cual es consistente con estudios anteriores en otras especies. Esto se debe a que los aceites vegetales contienen compuestos que reducen los niveles de colesterol (Fernández & West, 2005; Plaza, 2001).

La sustitución de aceite de pescado por mezclas de aceites vegetales no tuvo un impacto importante en la histología intestinal, pero se observó una esteatosis masiva en todos los hígados de los peces, lo que sugiere una disfunción en el metabolismo de lípidos. Este mal metabolismo de lípidos puede tener mayor efecto en aquellas dietas con alta cantidad de lípidos y por tanto influir en el crecimiento, tal y como se vio en las dietas para *seriola mediterránea* con mayor

porcentaje de lípidos que mostraron un menor crecimiento para un mismo nivel de proteína (Tomás-Vidal et al., 2008).

Aunque a nivel histológico no se encontraron grandes diferencias, sí que se observó un cambio en la microbiota con la sustitución del aceite de pescado, que provocó un aumento de la diversidad y riqueza, esto puede ser beneficioso para prevenir el establecimiento de patógenos (Banerjee & Ray, 2017). Con la sustitución de AP se observó un aumento de bacterias de la clase *Ruminococcaceae*, relacionadas con la producción de butirato a partir de polisacáridos complejos no digeribles, mejorando la capacidad de obtener energía de la dieta, aumentando la barrera epitelial intestinal y modulando la función inmune (Parma et al., 2020).

Además de las evaluaciones más habituales a la hora de valorar la utilización de aceites alternativos al aceite de pescado, en otros estudios se han analizado aspectos más globales como puede ser la evaluación de la huella de carbono (Bordignon, 2021) o análisis económicos y FIFO relacionados con la sustitución del aceite de pescado (Monge-Ortiz, 2020) (Figura 7.2).

En el estudio de la afección sobre la huella de carbono de la sustitución del aceite de pescado en piensos para *Seriola dumerili* (Bordignon et al., 2021), se aplicaron dos enfoques de evaluación del impacto ambiental: el enfoque consecuencial y el atribucional. Ambos enfoques revelaron resultados similares en cuanto al potencial de eutrofización, con la producción marginal de la opción sin aceite de pescado (FO 0) teniendo un mayor impacto en comparación con la opción 100% de aceite de pescado (FO 100).

Además, la producción marginal de la dieta basada en aceite vegetal no afectó el agotamiento de los recursos bióticos marinos. Sin embargo, es esencial tener en cuenta las posibles compensaciones entre la reducción del impacto sobre la biodiversidad y las reservas de los ecosistemas marinos y el aumento de la presión sobre la biodiversidad terrestre, especialmente en biomas tropicales donde predominan los cultivos de oleaginosas como la soja.

En el caso de la valoración económica (Monge-Ortiz, 2020) con la sustitución del aceite de pescado no se encontraron diferencias entre el coste de producción de piensos con y sin sustitución, además a este análisis económico hay que sumarle el precio de los probióticos añadidos que incrementarían el coste del pienso y por tanto la disminución de beneficio económico.

Los ensayos realizados durante esta tesis y otros que han sido publicados anteriormente indican que es posible sustituir prácticamente todo el aceite de pescado en la alimentación de los juveniles de seriola (*S. dumerili*) por una mezcla de aceites vegetales, teniendo en cuenta que las dietas sí que incluyen harina de pescado, que generalmente contiene entre un 8% y un 15% de lípidos, por lo que el aceite aportado sería en torno a un 5%, sin causar efectos adversos en el crecimiento, rendimiento del pez y parámetros nutricionales, así como que la sustitución total de aceite de pescado por aceites vegetales no afectó significativamente el estrés oxidativo en la *Seriola dumerili*. Esta proporción de aceite aportada por la HP podría cumplir con los requerimientos mínimos de ácidos grasos esenciales (especialmente EPA y DHA), tal y como sucede en la dorada que con un 4-5% de aceite de pescado los cubre (Oliva-Teles, 2012). En la figura 7.2 se puede ver el nivel máximo de sustitución del AP sin que tenga efecto significativo en los aspectos analizados. Se pudo sustituir un 100% del AP por mezcla de aceites sin afectar al crecimiento, la microbiota y a la supervivencia (si tiene un 53% de HP), hasta un 75% sin afectar a la histología intestinal y hepática ni al estrés y hasta un 50% de sustitución si se tiene en cuenta el valor nutricional. Por lo tanto, es posible sustituir un 50 % de AP sin afectar significativamente a ninguno de los aspectos estudiados.

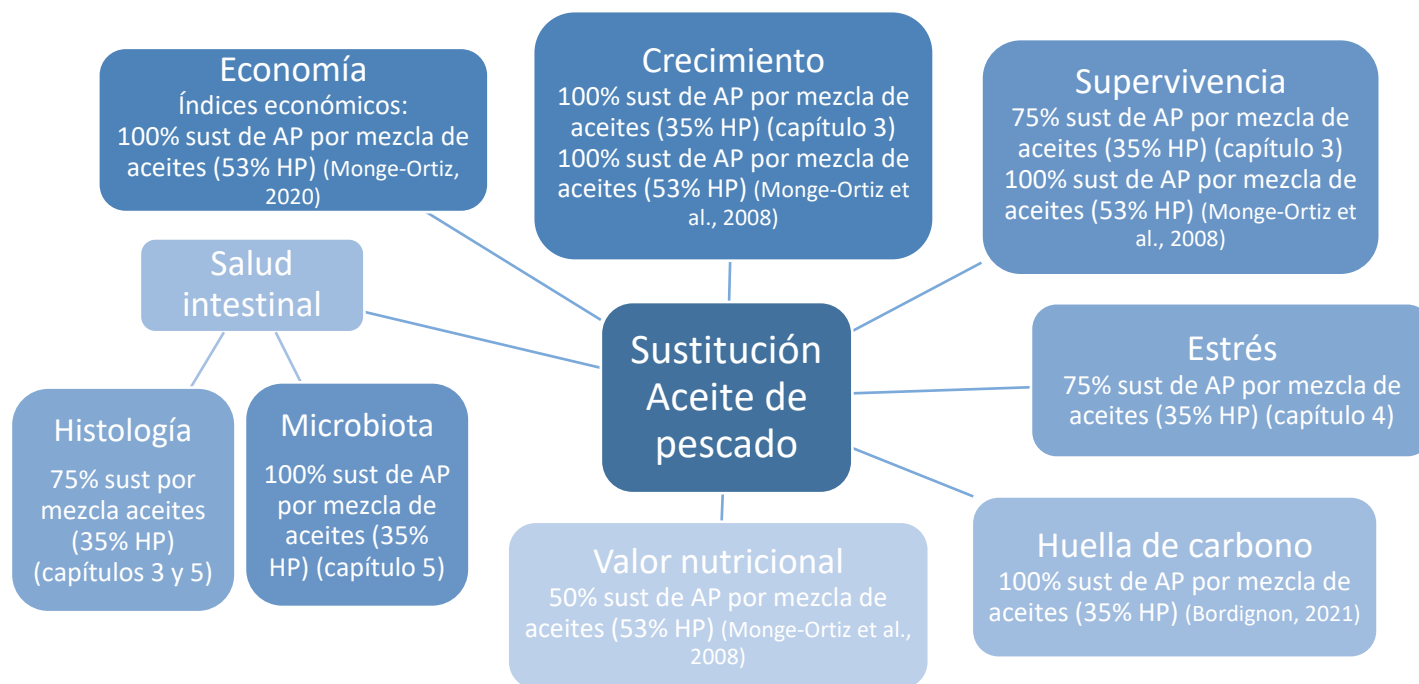


Figura 7.2 Esquema de los niveles máximos de sustitución del AP en piensos para *Seriola dumerili* sin que tenga efecto sobre los distintos aspectos analizados.

2. Sustitución de HP

En el estudio de la sustitución de harina de pescado en la alimentación de la *Seriola dumerili* (capítulo 5) se utilizaron diferentes técnicas para evaluarlo, especialmente los efectos en la salud de los peces, estudiando la histología, tanto intestinal como hepática y la microbiota intestinal (Figura 7.1).

La sustitución total de la harina de pescado por fuentes alternativas de proteína causó una alta mortalidad durante los últimos 30 días de ensayo (un 75%). Esto podría deberse a que la dieta sin HP tuviese una deficiencia de nutrientes, consecuencia de la baja inclusión en la dieta o por la baja digestibilidad de los mismos por la presencia de factores antinutricionales en las fuentes alternativas de proteínas (Monge-Ortiz et al., 2018) que con el paso de los días afectase en mayor medida a dichos animales causando la muerte de estos. De hecho, la supervivencia de los peces alimentados con la dieta FM0 fue considerablemente menor en comparación con las otras dietas, posiblemente debido a la inflamación intestinal inducida por las fuentes de proteínas vegetales, especialmente las leguminosas (Krogdahl et al., 2005). Esta inflamación se caracteriza por cambios en la morfología intestinal y la infiltración de células inflamatorias. En el análisis histológico, se encontraron diferencias en el intestino posterior en la anchura de la lámina propia y del tamaño de las vellosidades tanto anchura como en longitud, en todos casos ese aumento se produjo con el aumento de la sustitución de la harina de pescado, lo que evidenciaría la inflamación en el intestino distal.

Varios estudios llevados a cabo con la misma especie mostraron también diferencias en el crecimiento a medida que aumentaba la sustitución de la harina de pescado por fuentes alternativas de proteínas (Jover et al., 1999; Monge-Ortiz, Tomás-Vidal, Gallardo-Álvarez, et al., 2018; Tomás-Vidal et al., 2005, 2008).

Del mismo modo que se encontraron diferencias a nivel histológico, con el análisis de la microbiota intestinal con la sustitución del AP, también se observaron diferencias cuando se sustituyó la harina de pescado, esto también se ha visto en otras especies del género *Seriola*

(Dam et al., 2020). La sustitución de la HP disminuyó la riqueza y abundancia de la microbiota, esto se puede deber a un aumento del estrés o reducción de la comida (Singh et al., 2019; Zha et al., 2018). Aunque el filo dominante en todos los grupos sea el Proteobacteria, en los peces con sustitución de HP hay un aumento de *Photobacterium*, *Virionaceae* y *Firmicutes*, éste último relacionado con el metabolismo de carbohidratos (Lau et al., 2022; M. Zhang et al., 2014). También con la sustitución de HP las actinobacterias aumentaron, lo que podría deberse a que no se han cubierto adecuadamente las necesidades dietéticas, ya que se conoce su papel como productor de metabolitos secundarios en el intestino (Aguilera et al., 2013).

La sustitución total de la harina de pescado por fuentes alternativas de proteínas presentó problemas de supervivencia y salud intestinal. Una sustitución parcial de hasta un 66% de la harina de pescado parece ser una opción viable, ya que no mostró efectos negativos significativos en la histología intestinal y hepática ni en el crecimiento, aunque sí afectó a la microbiota.

En el caso de la valoración económica de la sustitución proteica se destacan diferencias significativas únicamente en el índice de conversión económica (ICE) (Monge-Ortiz, 2020) se evidencia que la sustitución por fuentes de proteínas alternativas resulta más rentable. Esto se debe a que el valor de la harina de pollo y del krill desengrasado es considerablemente menor en comparación con el de la harina de pescado.

En la Figura 7.3 se muestran los niveles máximos de sustitución de HP por otro tipo de fuentes proteicas que se han evaluado y no presentaron diferencias en los aspectos analizados. Fue posible sustituir completamente la harina de pescado por una mezcla de harinas sin afectar al crecimiento, mientras que si la sustitución era únicamente por una harina solo se pudo hasta un 50%. Una sustitución del 66% por mezcla de harinas no afectó a la salud intestinal, pero para no encontrar diferencias solo se pudo sustituir la HP en un 33%. También se obtuvo que a partir de un 33% de sustitución de la HP aumentó el beneficio económico.

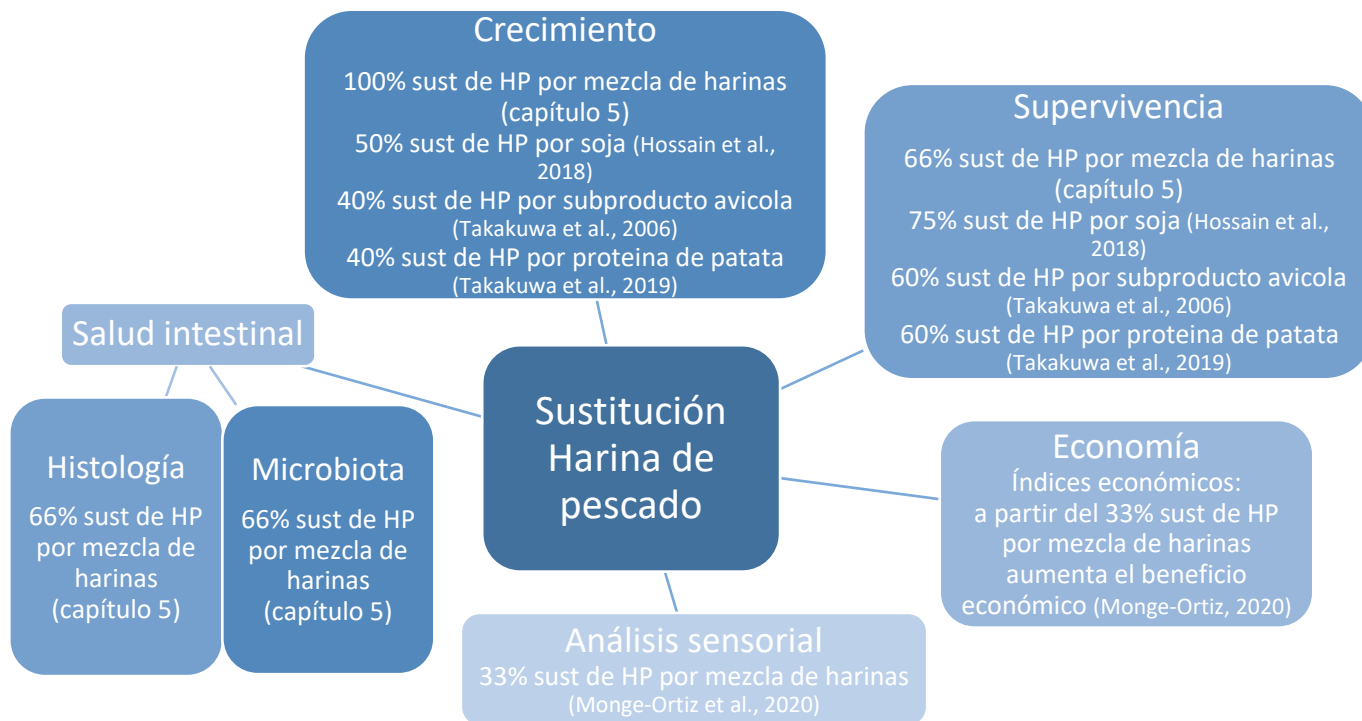


Figura 7.3 Esquema de los niveles máximos de sustitución de la HP en piensos para *Seriola dumerili* sin que tenga efecto sobre los distintos aspectos analizados.

3. Utilización de probióticos

La adición de probióticos en dietas para peces ha sido objeto de investigación en el contexto de la sustitución del aceite de pescado. Los probióticos son microorganismos vivos beneficiosos que pueden proporcionar varios efectos positivos en la salud y el rendimiento de los peces cuando se administran de manera adecuada.

En el caso de los estudios realizados en el transcurso de esta tesis no se observaron efectos positivos notables con la administración de probióticos, no tuvo un efecto a la hora de evaluar el estrés oxidativo, ya que no se encontraron diferencias en la actividad de las enzimas antioxidantes ni en la peroxidación lipídica, tampoco afectó a los parámetros hematológicos. En el crecimiento de los peces alimentados con la dieta con el probiótico presento pocos efectos respecto a los peces de la dieta sin él, únicamente se encontró una reducción de la mortalidad.

Algunos estudios han demostrado que la adición de probióticos en dietas con sustitución de aceite de pescado puede aumentar significativamente la supervivencia y el rendimiento de los peces (Acar & Türker, 2018; Liu et al., 2020). Los probióticos pueden ayudar a mitigar los efectos negativos del estrés y la inmunosupresión causados por la sustitución del aceite de pescado, lo que a su vez mejora la salud y el crecimiento de los peces.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que los efectos de los probióticos pueden variar dependiendo del tipo de probiótico utilizado, las condiciones específicas de cultivo y las interacciones con otros componentes de la dieta. Por lo tanto, se necesitan más investigaciones para comprender completamente la relación entre la adición de probióticos y la sustitución del aceite de pescado en las dietas para peces, especialmente en especies como la *Seriola dumerili*.

Lactobacillus sp. es un tipo de bacteria probiótica que pertenece al género *Lactobacillus*, que se encuentra de forma natural en el tracto gastrointestinal de muchos animales, incluidos los peces. En el caso específico de *Lactobacillus sp.*, una cepa probiótica ampliamente estudiada en la acuicultura, se han realizado investigaciones para

evaluar su efecto en la dieta de peces, incluida la sustitución del aceite de pescado. La adición de *Lactobacillus sp.* a las dietas de peces, incluida la *Seriola dumerili*, ha mostrado diversos efectos beneficiosos para la salud y el rendimiento de los animales (Aarti et al., 2017; Wu et al., 2018).

Algunos estudios han demostrado que la suplementación de dietas con *Lactobacillus sp.* mejora la digestibilidad del alimento y aumenta la absorción de nutrientes en los peces, lo que conduce a un mejor crecimiento y desarrollo. Además, se ha observado que esta bacteria probiótica puede modular la composición de la microbiota gastrointestinal, promoviendo un equilibrio de bacterias beneficiosas y reduciendo la presencia de patógenos perjudiciales en el intestino (Son et al., 2009).

La presencia de *Lactobacillus brevis* en el tracto digestivo también se ha relacionado con una mejora en la función inmunológica de los peces. Se ha observado que esta bacteria puede estimular la respuesta inmunológica innata, aumentando la actividad de células inmunitarias como los macrófagos y mejorando la resistencia a enfermedades infecciosas. En el contexto de la sustitución del aceite de pescado en las dietas, la adición de *Lactobacillus sp.* puede ser especialmente beneficiosa. La sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales puede alterar la composición de ácidos grasos en la dieta, lo que podría afectar negativamente el sistema inmunológico y el rendimiento de los peces. Sin embargo, la presencia de este probiótico en la dieta podría ayudar a compensar estos efectos negativos, mejorando la respuesta inmunológica y mitigando los impactos del estrés inducido por la sustitución del aceite de pescado (Akhter et al., 2015; Nikoskelainen et al., 2001).

Es importante destacar que los efectos específicos de *Lactobacillus sp.* en la dieta de *la Seriola dumerili* pueden variar según las condiciones de producción, la cepa específica de *Lactobacillus* utilizada y la interacción con otros componentes de la dieta. Por lo tanto, se necesita más investigación para comprender completamente el papel del probiótico en la dieta de peces, especialmente en el contexto de la sustitución del aceite de pescado.

4. Producción de *Seriola dumerili*. Vistas al futuro

La seriola es una especie de gran valor comercial en la industria acuícola debido a su excelente calidad de carne, sabor y textura, lo que la hace muy solicitada en el mercado de pescados de alta gama. Además, es una especie de crecimiento rápido en comparación con algunas otras especies, lo que permite obtener un tamaño comercial en un tiempo relativamente corto en comparación con otras especies acuícolas.

Esta especie ha demostrado una buena adaptabilidad a la vida en cautividad y a las condiciones de acuicultura, lo que facilita su producción en sistemas de producción controlados. Asimismo, la *Seriola dumerili* ofrece una opción de diversificación para la acuicultura, lo que permite a los productores ampliar su oferta y reducir la dependencia de otras especies más tradicionales. Puede ofrecer oportunidades de empleo y desarrollo económico en áreas donde la pesca tradicional puede ser limitada.

La *Seriola dumerili* es una especie que requiere condiciones específicas de temperatura, salinidad y calidad del agua para un crecimiento óptimo. Mantener estas condiciones en un entorno controlado puede ser costoso y complicado. Además, como para cualquier especie de acuicultura la alimentación adecuada es esencial, sobre todo teniendo en cuenta que la seriola es una especie muy carnívora y con unos requerimientos nutricionales específicos. Por lo que desarrollar dietas adecuadas y garantizar que los peces reciban los nutrientes necesarios puede ser un desafío.

La producción de *Seriola dumerili* puede ser costosa debido a los altos costos de la alimentación, especialmente si se utilizan dietas basadas en harina de pescado, cuyos precios pueden ser volátiles. Además, al ser un pez carnívoro, la *Seriola dumerili* requiere una dieta rica en proteínas marinas, lo que puede generar preocupaciones sobre la sostenibilidad y la competencia con la industria pesquera. Este mayor coste de producción se ve compensado por un rápido crecimiento lo que provoca que el índice de beneficio económico (IBE) sea mayor en seriola mediterránea que en otras especies que se producen en el

mediterráneo, como pueden ser dorada, lubina y sargo. Mientras que la seriola presentó un IBE de alrededor de 4 €/kg (Monge-Ortiz, 2020), la lubina se quedó en 1,8 €/kg (Adaklı & Taşbozan, 2015), el sargo en 1,5 €/kg (Hernández et al., 2007) y la dorada entre 1,28 y 1,43 €/kg (Silvia Martínez-Llorens et al., 2007; Moutinho et al., 2016; Sánchez Lozano et al., 2007).

Aunque hay una demanda creciente para la *Seriola dumerili*, su mercado puede estar limitado a segmentos específicos de alta gama debido a su valor y precio relativamente elevados. Por otro lado, la *Seriola dumerili* necesita suficiente espacio en los sistemas de producción para su desarrollo adecuado, lo que puede limitar su producción en instalaciones con espacio restringido. Al igual que en cualquier sistema de cría de animales, las enfermedades pueden ser un problema en la acuicultura de *Seriola dumerili*. Además, la seriola puede ser muy susceptible a ciertas enfermedades, lo que puede afectar la producción si no se maneja adecuadamente. Los principales ectoparásitos que afectan a la producción de *Seriola dumerili* son los platelmintos monogéneos *Zeuxapata seriolae*, *Benedenia seriolae*, *Neobenedenia girellae* y *Neobenedenia melleni*, estos parásitos se adhieren a la superficie externa del pez causando heridas, hemorragias y facilitando las infecciones bacterianas (Buchmann & Lindenstrøm, 2002). Los efectos económicos de la aparición de parásitos en una instalación pueden ser muy elevados ya que puede no se debe considerar únicamente las grandes mortalidades provocadas por los parásitos, sino también el efecto en la productividad (menor crecimiento, alteraciones en la TCA o presentar aspecto inadecuado para el consumidor entre otros) (Shinn et al., 2015) aunque esa pérdida de beneficio económico es difícil de calcular. Además, el control de enfermedades y el mantenimiento de la salud de los peces pueden ser complicados. Las pérdidas económicas notificadas por los efectos de parásitos monogéneos en la producción de carángidos fue de 220 millones de dólares entre 2003 y 2005 (Shinn et al., 2015).

La acuicultura puede proporcionar una oferta constante de productos, reduciendo la dependencia de las fluctuaciones estacionales de la pesca silvestre. La acuicultura de la *Seriola dumerili* impulsa la

investigación y el desarrollo en áreas como la nutrición, la salud de los peces y la mejora genética. Esto puede llevar a la creación de cepas más resistentes y eficientes en términos de conversión alimentaria. Con una gestión adecuada, la acuicultura de la *Seriola dumerili* puede operar de manera sostenible, minimizando los impactos ambientales y contribuyendo a la seguridad alimentaria. Para ello se deberían mejorar los sistemas de recirculación, haciendo especial hincapié en la desinfección del agua para tratar de minimizar la aparición de parásitos que son uno de los grandes enemigos de la producción de la seriola. Otra posible solución es la utilización de materias primas fermentadas para la fabricación de piensos y así poder llegar a las necesidades proteicas de la *Seriola dumerili*.

Capítulo 8:

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral se puede concluir que:

Respecto a la sustitución del aceite de pescado en la seriola mediterránea:

- › La sustitución total del aceite de pescado por una mezcla de aceites vegetales no afecta al crecimiento ni a los parámetros nutritivos.
- › La supervivencia se ve afectada por la sustitución completa del aceite de pescado.
- › Hay una clara influencia en el perfil de ácidos grasos de los peces en función del nivel de aceite de pescado de la dieta ingerida, presentando una mayor concentración de ácido α -linoleico y un mayor ratio EPA/DHA, los peces alimentados sin aceite de pescado.
- › La morfología intestinal se vio influenciada por la sustitución completa del AP, que provocó un engrosamiento de la lámina propia.
- › La sustitución total de aceite de pescado afectó el nivel de estrés oxidativo, mientras que con un 25% de inclusión no se encontraron diferencias.
- › La sustitución completa del aceite de pescado redujo el nivel de colesterol en sangre de los peces.
- › La microbiota intestinal se vio afectada por la sustitución del aceite de pescado, aumentando la riqueza de especies.
- › La adición de probióticos no tuvo efectos positivos en los distintos parámetros analizados.

Respecto a la sustitución de la harina de pescado:

- › La sustitución completa de la harina de pescado provocó una mayor mortalidad.
- › La sustitución de la harina de pescado afectó a la microbiota intestinal, disminuyendo el número de taxones y la riqueza de la misma.

- › La sustitución total de la harina de pescado afectó la fisiología del intestino posterior provocando un ensanchamiento de la lámina propia y en el caso del hígado, una disminución del tamaño de los hepatocitos.

Capítulo 9:

REFERENCIAS GENERALES

- Aarti, C., Khushro, A., Varghese, R., Arasu, M. V., Agastian, P., Al-Dhabi, N. A., Ilavenil, S., & Choi, K. C. (2017). In vitro studies on probiotic and antioxidant properties of *Lactobacillus brevis* strain LAP2 isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India. *LWT*, 86, 438–446. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.07.055>
- Abarike, E. D., Cai, J., Lu, Y., Yu, H., Chen, L., Jian, J., Tang, J., Jun, L., & Kuebutornye, F. K. A. (2018). Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 82, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.037>
- Abdel-Latif, H. M. R., Chaklader, M. R., Shukry, M., Ahmed, H. A., & Khallaf, M. A. (2023). A multispecies probiotic modulates growth, digestive enzymes, immunity, hepatic antioxidant activity, and disease resistance of *Pangasianodon hypophthalmus* fingerlings. *Aquaculture*, 563, 738948. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738948>
- Abellán-Martínez, E., & Arnal, I. (2013). *Diversificación de especies en la piscicultura marina española*.
- Acar, Ü., Parrino, V., Kesbiç, O. S., & Paro, G. Lo. (2018). Effects of Different Levels of Pomegranate Seed Oil on Some Blood Parameters and Disease Resistance Against *Yersinia ruckeri* in Rainbow Trout. *Frontiers in Physiology*, 9(596), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00596>
- Acar, Ü., & Türker, A. (2018). Response of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to unrefined peanut oil diets: Effect on growth performance, fish health and fillet fatty acid composition. *Aquaculture Nutrition*, 24, 292–299. <https://doi.org/10.1111/anu.12559>
- Adamidou, S., Nengas, I., Henry, M., Grigorakis, K., Rigos, G., Nikolopoulou, D., Kotzamanis, Y., Bell, G. J., & Jauncey, K. (2009). Growth, feed utilization, health and organoleptic characteristics

- of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed extruded diets including low and high levels of three different legumes. *Aquaculture*, 293(3–4), 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.045>
- Adorian, T. J., Jamali, H., Farsani, H. G., Darvishi, P., Hasanpour, S., Bagheri, T., & Roozbehfar, R. (2019). Effects of Probiotic Bacteria *Bacillus* on Growth Performance, Digestive Enzyme Activity, and Hematological Parameters of Asian Sea Bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(1), 248–255. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9393-z>
- Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Aguilar-Manjarrez, J., Lovatelli, A., & Soto, D. (2013). *Expanding mariculture farther offshore: technical, environmental, spatial and governance challenges*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2989.1927>
- Aguilera, E., Yany, G., & Romero, J. (2013). Cultivable intestinal microbiota of *Seriola lalandi* Cultivable intestinal microbiota of yellowtail juveniles (*Seriola lalandi*) in an aquaculture system. In *Lat. Am. J. Aquat. Res* (Vol. 41, Issue 3). <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/>
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., & Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2), 733–741. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.038>
- Álvarez-Pellitero, M. del P. (2013). *Mucosal intestinal immunity and response to parasite infections in ectothermic vertebrates*.
- Alvheim, A. R., Torstensen, B. E., Lin, Y. H., Lillefosse, H. H., Lock, E.-J., Madsen, L., Hibbeln, J. R., & Malde, M. K. (2013). Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-arachidonoylglycerol and anandamide in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and mice, and induces weight gain and inflammation in mice. *British Journal of*

Nutrition, 109(8), 1508–1517. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0007114512003364>

Aly, S. M., Abdel-Galil Ahmed, Y., Abdel-Aziz Ghareeb, A., & Mohamed, M. F. (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(1–2), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.013>

Amoah, K., Huang, Q. C., Tan, B. P., Zhang, S., Chi, S. Y., Yang, Q. H., Liu, H. Y., & Dong, X. H. (2019). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 87, 796–808. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.029>

AOAC. (1990). *Official methods of analysis*, 15th edn. (Associatio).

APROMAR. (2022). *La Acuicultura en España*.

Aragão, C., Gonçalves, A. T., Costas, B., Azeredo, R., Xavier, M. J., & Engrola, S. (2022). Alternative Proteins for Fish Diets: Implications beyond Growth. *Animals*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/ani12091211>

Asche, F., & Bjørndal, T. (2011). The Economics of Salmon Aquaculture, Second Edition. *The Economics of Salmon Aquaculture, Second Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781119993384>

Aslaksen, M. A., Kraugerud, O. F., Penn, M., Svihus, B., Denstadli, V., Jørgensen, H. Y., Hillestad, M., Krogdahl, Å., & Storebakken, T. (2007). Screening of nutrient digestibilities and intestinal pathologies in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with legumes, oilseeds, or cereals. *Aquaculture*, 272(1–4), 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.222>

Badillo-Zapata, D., Correa-Reyes, G., D'Abramo, L., Lazo, J., Toro-Vázquez, J., & Viana, M. (2010). Effect of replacing dietary fish oil

- with vegetable oils on the fatty acid composition of muscle tissue of juvenile California halibut (*Paralichthys californicus*). *Ciencias Marinas*, 36(2), 121–133. <https://doi.org/10.7773/cm.v36i2.1637>
- Baeza-Ariño, R., Martínez-Llorens, S., Nogales-Mérida, S., Jover-Cerda, M., & Tomás-Vidal, A. (2016). Study of liver and gut alterations in sea bream, *Sparus aurata* L., fed a mixture of vegetable protein concentrates. *Aquaculture Research*, 47(2), 460–471. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/are.12507>
- Banerjee, G., & Ray, A. K. (2017). Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism. In *Symbiosis* (Vol. 72, Issue 1). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0441-8>
- Bell, J. G., Henderson, R. J., Tocher, D. R., McGhee, F., Dick, J. R., Porter, A., Smullen, R. P., & Sargent, J. R. (2002). Substituting Fish Oil with Crude Palm Oil in the Diet of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Affects Muscle Fatty Acid Composition and Hepatic Fatty Acid Metabolism. *The Journal of Nutrition*, 132(2), 222–230. <https://doi.org/10.1093/jn/132.2.222>
- Bell, J. G., Mcevoy, J., Tocher, D. R., McGhee, F., Campbell, P. J., & Sargent, J. R. (2001). Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *American Society for Nutritional Sciences*, 2(22), 1535–1543.
- Bell, J. G., Tocher, D. R., Farndale, B. M., Mcvicar, A. H., & Sargent, J. R. (1999). Effects of essential fatty acid-deficient diets on growth, mortality, tissue histopathology and fatty acid compositions in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). In *Fish Physiology and Biochemistry* (Vol. 20).
- Benedito-Palos, L., Navarro, J. C., Kaushik, S., & Pérez-Sánchez, J. (2010). Tissue-specific robustness of fatty acid signatures in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed practical diets with a combined high replacement of fish meal and fish oil.

Journal of Animal Science, 88(5), 1759–1770.
<https://doi.org/10.2527/jas.2009-2564>

Benedito-palos, L., Navarro, J. C., Sitjà-Bobadilla, A., Bell, J. G., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., Benedito-palos, L., Navarro, J. C., & Sitja, A. (2008). High levels of vegetable oils in plant protein-rich diets fed to gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Growth performance, muscle fatty acid profiles and histological alterations of target tissues. *British Journal of Nutrition*, 100(5), 992–1003.
<https://doi.org/10.1017/S0007114508966071>

Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Caldach-Giner, J. A., Kaushik, S., & Pérez-Sánchez, J. (2007). Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture*, 267(1–4), 199–212.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.011>

Bianchi, D., Bertrand, O., Haupt, K., & Coello, N. (2001). Effect of gluconic acid as a secondary carbon source on non-growing L-lysine producers cells of *Corynebacterium glutamicum*. Purification and properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Enzyme Microb Technol*, 7, 754–759.
[https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(01\)00310-6](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(01)00310-6)

Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., & Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>

Bonaldo, A., Roem, A. J., Fagioli, P., Pecchini, A., Cipollini, I., & Gatta, P. (2008). Influence of dietary levels of soybean meal on the performance and gut histology of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture Research*, 39(9), 970–978.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01958.x>

- Bonvini, E., Bonaldo, A., Parma, L., Mandrioli, L., Sirri, R., Grandi, M., Fontanillas, R., Viroli, C., & Gatta, P. P. (2018). Feeding European sea bass with increasing dietary fibre levels: Impact on growth, blood biochemistry, gut histology, gut evacuation. *Aquaculture*, 494, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.017>
- Bordignon, F. (2021). *Feeding strategies and rearing techniques for a sustainable aquaculture*. Universitat Politècnica de València.
- Bordignon, F., Sturaro, E., Trocino, A., Martínez-Llorens, S., Tomás-Vidal, A., & Berton, M. (2021, July). *Life cycle assessment of fish oil substitution with vegetable oils in diets for *Seriola dumerili**.
- Bordignon, F., Tomás-Vidal, A., Trocino, A., Milián Sorribes, M. C., Jover-Cerdá, M., & Martínez-Llorens, S. (2020). Fatty Acid Signatures in Different Tissues of Mediterranean Yellowtail, *Seriola dumerili* (Risso, 1810), Fed Diets Containing Different Levels of Vegetable and Fish Oils. *Animals*, 10(2), 198. <https://doi.org/10.3390/ani10020198>
- Bowyer, J. N., Qin, J. G., Smullen, R. P., & Stone, D. A. J. (2012). Replacement of fish oil by poultry oil and canola oil in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) at optimal and suboptimal temperatures. *Aquaculture*, 356–357, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.014>
- Bowyer, J. N., Rout-Pitt, N., Bain, P. A., Stone, D. A. J., & Schuller, K. A. (2012). Dietary fish oil replacement with canola oil up-regulates glutathione peroxidase 1 gene expression in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 162(4), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2012.04.002>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Brouwer, E. (1965). Report of sub-committee on constants and factors. In K. L. Blaxter (Ed.), *Proceedings of the Third EAAP Symposium on Energy Metabolism* (Publicatio, pp. 441–443). Academic Press.
- Buchmann, K., & Lindenstrøm, T. (2002). Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *International Journal for Parasitology*, 32(3), 309–319. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00332-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00332-0)
- Buddington, R. K., Chen, J. W., & Diamond, J. (1987). Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. *The Journal of Physiology*, 393(1), 261–281. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016823>
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52(C), 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Burrells, C., Williams, P. D., Southgate, P. J., & Crampton, V. O. (1999). Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72(3–4), 277–288. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00143-9](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00143-9)
- Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., Kjørsvik, E., Fernandez, A. J., & Rosenlund, G. (2004). Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus auratus* L., caused by short or long term feeding with vegetable oils as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases*, 27, 531–541.
- Caballero, M. J., López-Calero, G., Socorro, J., Roo, F. J., Izquierdo, M. S., & Fernández, A. J. (1999). Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 179(1–4), 277–290. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00165-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00165-9)
- Calduch-Giner, J. A., Sitjà-Bobadilla, A., Davey, G. C., Cairns, M. T., Kaushik, S., & Pérez-Sánchez, J. (2012). Dietary vegetable oils do not alter the intestine transcriptome of gilthead sea bream

- (*Sparus aurata*), but modulate the transcriptomic response to infection with *Enteromyxum leei*. *BMC Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-470>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-paniagua, S. T., Meseguer, J., Ángel, M., & Ángeles, M. (2013). Fish & Shellfish Immunology Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(5), 1063–1070. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.015>
- Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-paniagua, S. T., Meseguer, J., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2012). Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. *Cell and Tissue Research*, 350, 477–489. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1495-4>
- Çiltaş, A., Erdoğan, O., Hisar, O., & Çiftçi, M. (2003). Effects of Chloramine-T And CuSO₄ On Enzyme Activity Of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase From Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Erythrocytes In Vitro An In Vivo. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 55(3), 187–196.
- Dam, C. T. M., Booth, M., Pirozzi, I., Salini, M., Smullen, R., Ventura, T., & Elizur, A. (2020). Alternative feed raw materials modulate intestinal microbiota and its relationship with digestibility in Yellowtail Kingfish *Seriola lalandi*. *Fishes*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/fishes5020014>
- Das, J., Ghosh, J., Manna, P., & Sil, P. C. (2012). Taurine protects rat testes against doxorubicin-induced oxidative stress as well as p53, Fas and caspase 12-mediated apoptosis. *Amino Acids*, 42(5), 1839–1855. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0904-4>

- Dawood, M. A. O., Koshio, S., Ishikawa, M., & Yokoyama, S. (2015). Effects of partial substitution of fish meal by soybean meal with or without heat-killed lactobacillus plantarum (LP20) on growth performance, digestibility, and immune response of amberjack, *Seriola dumerili* juveniles. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/514196>
- de la Gándara, F. (Fernando). (2006). ¿Por qué no se ha desarrollado el cultivo de *Seriola dumerili* en el Mediterráneo? *Comunicación Técnica CIVA*, 326–340. <http://hdl.handle.net/10508/1007>
- De Schrijver, R., & Ollevier, F. (2000). Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture*, 186(1–2), 107–116. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00372-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00372-5)
- Desai, A. R., Links, M. G., Collins, S. A., Mansfield, G. S., Drew, M. D., Van Kessel, A. G., & Hill, J. E. (2012). Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350–353, 134–142. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2012.04.005>
- Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Moate, R., Davies, S. J., Spring, P., Sweetman, J., & Bradley, G. (2009). Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)1. *Journal of Animal Science*, 87(10), 3226–3234. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1428>
- Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R., & Davies, S. J. (2010). Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 300(1–4), 182–188. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2010.01.015>
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The gut microbiota of marine fish. In *Frontiers in Microbiology*

- (Vol. 9, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>
- Eichmiller, J. J., Hamilton, M. J., Staley, C., Sadowsky, M. J., & Sorensen, P. W. (2016). Environment shapes the fecal microbiome of invasive carp species. *Microbiome*, 4. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0190-1>
- El-Dakar, A. Y., Shalaby, S. M., & Saoud, I. P. (2007). Assessing the use of a dietary probiotic / prebiotic as an enhancer of spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus* survival and growth. *Aquaculture Nutrition*, 13, 407–412.
- Espe, M., Lemme, A., Petri, A., & El-Mowafi, A. (2006). Can Atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fish meal? *Aquaculture*, 255(1–4), 255–262. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2005.12.030>
- Estensoro, I., Jung-Schroers, V., Álvarez-Pellitero, P., Steinhagen, D., & Sitjà-Bobadilla, A. (2013). Effects of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infection on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) (Teleostei) intestinal mucus: glycoprotein profile and bacterial adhesion. *Parasitology Research*, 112(2), 567–576. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3168-3>
- Estruch, G., Collado, M. C., Peñaranda, D. S., Tomás-Vidal, A., Jover-Cerdá, M., Pérez Martínez, G., Martínez-Llorens, S., & Moreau, C. S. (2015). Impact of fish meal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on the gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16S rRNA gene. *PLoS ONE*, 10(8).
- Evdokimova, N. V., & Chernenkaya, T. V. (2018). Bacteria *Atopobium* genus and their role in development of infectious inflammatory diseases. *Medical Alphabet*, 2(35), 43–45.
- Fakriadis, I., Sigelaki, I., Papadaki, M., Papandroulakis, N., Raftopoulos, A., Tsakoniti, K., & Mylonas, C. C. (2020). Control of reproduction of greater amberjack *Seriola dumerili* reared in aquaculture

- p facilities.
- Aquaculture*
- , 519, 734880.
-
- <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2019.734880>
- FAO. (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. In *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- Feist, S. W. (2009). Atlas of fish histology - Edited by F. Genten, E. Terwinghe and A. Danguy. *Journal of Fish Biology*, 75(3), 757–758. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02318_3.x
- Fernández, M., & West, K. (2005). Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *The Journal of Nutrition*, 135 9, 2075–2078.
- Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). [12] Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105(C), 114–120. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1)
- Førde-Skjærvik, O., Refstie, S., Aslaksen, M. A., & Skrede, A. (2006). Digestibility of diets containing different soybean meals in Atlantic cod (*Gadus morhua*); comparison of collection methods and mapping of digestibility in different sections of the gastrointestinal tract. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.009>
- Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Hurtado, R., Grigorakis, K., Karacostas, I., Nengas, I., Rigos, G., Kotzamanis, Y., Venou, B., & Alexis, M. N. (2009). Fish oil substitution by vegetable oils in commercial diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.); effects on growth performance, flesh quality and fillet fatty acid profile. Recovery of fatty acid profiles by a fish oil finishing diet under fluctuati. *Aquaculture*, 289(3–4), 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.01.023>
- Francis, G., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2001). Antinutrinional factors present in plant-delived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199, 197–227.

- Fukada, H., Kitagima, R., Shinagawa, J., Morino, H., & Masumoto, T. (2020). Effects of complete replacement of fish oil with plant oil mixtures and algal meal on growth performance and fatty acid composition in juvenile yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fisheries Science*, 86(1), 107–118. <https://doi.org/10.1007/s12562-019-01361-9>
- Fukada, H., Taniguchi, E., Morioka, K., & Masumoto, T. (2017). Effects of replacing fish oil with canola oil on the growth performance, fatty acid composition and metabolic enzyme activity of juvenile yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel, 1845). *Aquaculture Research*, 48(12), 5928–5939. <https://doi.org/10.1111/are.13416>
- Gabr, G. A., Ibrahim, Y. S., Al-Shawi, S. G., Abosaooda, M., Gupta, J., Oudaha, K. H., Mavlonov, K., Jalil, A. T., Thalij, K. M., Mustafa, Y. F., Khodadadi, M., & Dadras, M. (2023). Single or combined consumption of resveratrol and the probiotic, *Lactobacillus acidophilus* attenuate the effects of crowding stress on growth, immune characteristics, and antioxidant defense in the common carp, (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Reports*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101471>
- Ganga, R., Montero, D., Bell, J. G., Atalah, E., Ganuza, E., Vega-Orellana, O., Tort, L., Acerete, L., Afonso, J. M., Benitez-Sanatana, T., Fernández Vaquero, A., & Izquierdo, M. (2011). Stress response in sea bream (*Sparus aurata*) held under crowded conditions and fed diets containing linseed and/or soybean oil. *Aquaculture*, 311(1–4), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.050>
- Gildberg, A., Johansen, A., & Bøggwald, J. (1995). Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 138(1–4), 23–34. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01144-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01144-7)
- Glencross, B. D. (2009). Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, 1(2),

- 71–124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2009.01006.x>
- Gonçalves, A. T., Maita, M., Futami, K., Endo, M., & Katagiri, T. (2011). Effects of a probiotic bacterial *Lactobacillus rhamnosus* dietary supplement on the crowding stress response of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science*, 77(4), 633–642. <https://doi.org/10.1007/s12562-011-0367-2>
- Gou, N., Ji, H., Zhong, M., Chang, Z., & Deng, W. (2021). Effects of dietary fish oil replacements with three vegetable oils on growth, fatty acid composition, antioxidant capacity, serum parameters and expression of lipid metabolism related genes in juvenile *Onychostoma macrolepis*. *Aquaculture Nutrition*, 27(1), 163–175. <https://doi.org/10.1111/anu.13174>
- Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106(1), 207–212. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6)
- Gu, M., Bai, N., Zhang, Y., & Krogdahl, Å. (2016). Soybean meal induces enteritis in turbot *Scophthalmus maximus* at high supplementation levels. *Aquaculture*, 464, 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.035>
- Guardiola, F. A., Saraiva-Fraga, M., Cuesta, A., & Esteban, M. A. (2018). Changes in natural haemolytic complement activity induced by stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 78, 317–321. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.056>
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., & Metailleur, R. (2004). *Nutrición y alimentación de peces y crustaceos*. (Mundi-Pren).
- Hedra, M. I., Galdames, J. A., Jimenez-Reyes, M. F., Reyes, A. E., Avendaño-Herrera, R., Romero, J., & Feijóo, C. G. (2013). Soybean Meal Induces Intestinal Inflammation in Zebrafish Larvae. *PLoS ONE*, 8(7), e69983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069983>

- Hetland, D. L., Jørgensen, S. M., Skjødt, K., Dale, O. B., Falk, K., Xu, C., Mikalsen, A. B., Grimholt, U., Gjøen, T., & Press, C. M. L. (2010). In situ localisation of major histocompatibility complex class I and class II and CD8 positive cells in infectious salmon anaemia virus (ISAV)-infected Atlantic salmon. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2009.09.011>
- Hidalgo, M. C., Skalli, A., Abella, E., Arizcun, M., & Cardenete, G. (2006). Dietary intake of probiotics and maslinic acid in juvenile dentex (*Dentex dentex* L.): effects on growth performance, survival and liver proteolytic activities. *Aquaculture Nutrition*, 12, 256–266.
- Hlordzi, V., Kuebutornye, F. K. A., Afriyie, G., Abarike, E. D., Lu, Y., Chi, S., & Anokyewaa, M. A. (2020). The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. *Aquaculture Reports*, 18, 100503. <https://doi.org/10.1016/J.AQREP.2020.100503>
- Hoseinifar, S. H., Yousefi, S., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F., & Carnevali, O. (2021). Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Fish: The Implications of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotics. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(2), 198–217. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1795616>
- Hossain, S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Sony, N. M., Islam, J., Maekawa, M., & Fujieda, T. (2018). Substitution of dietary fishmeal by soybean meal with inosine administration influences growth, digestibility, immunity, stress resistance and gut morphology of juvenile amberjack *Seriola dumerili*. *Aquaculture*, 488(February), 174–188. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.037>
- Huang, Y., Wen, X., Li, S., Li, W., & Zhu, D. (2016). Effects of Dietary Fish Oil Replacement with Palm Oil on the Growth, Feed Utilization, Biochemical Composition, and Antioxidant Status of Juvenile Chu's Croaker, *Nibea coibor*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(6), 786–797. <https://doi.org/10.1111/jwas.12307>

- Hundal, B. K., Liland, N. S., Rosenlund, G., Höglund, E., Araujo, P., Stubhaug, I., & Sissener, N. H. (2021). Increasing the dietary n-6/n-3 ratio alters the hepatic eicosanoid production after acute stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 534, 736272. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.736272>
- Ipatova, O. M., Prozorovskaia, N. N., Torkhovskaia, T. I., Baranova, V. S., & Guseva, D. A. (2004). [Biological effects of the soybean phospholipids]. *Biomeditsinskaiia Khimiia*, 50(5), 436—450. <http://europepmc.org/abstract/MED/15628593>
- Itoi, S., Okamura, T., Koyama, Y., & Sugita, H. (2006). Chitinolytic bacteria in the intestinal tract of Japanese coastal fishes. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(12), 1158–1163. <https://doi.org/10.1139/w06-082>
- Je, W., Min, J., Hasan, T., Lee, B., Gu, S., & Kong, I. (2019). Effects of probiotic supplementation of a plant-based protein diet on intestinal microbial diversity, digestive enzyme activity, intestinal structure, and immunity in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 92, 719–727. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.056>
- Jerez, S., Samper, M., Santamaría, F. J., Villamandos, J. E., Cejas, J. R., & Felipe, B. C. (2006). Natural spawning of greater amberjack (*Seriola dumerili*) kept in captivity in the Canary Islands. *Aquaculture*, 252(2–4), 199–207. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2005.06.031>
- Jin, M., Lu, Y., Yuan, Y., Li, Y., Qiu, H., Sun, P., Ma, H. N., Ding, L. Y., & Zhou, Q. C. (2017). Regulation of growth, antioxidant capacity, fatty acid profiles, hematological characteristics and expression of lipid related genes by different dietary n-3 highly unsaturated fatty acids in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *Aquaculture*, 471, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.004>
- Jöborn, A., Olsson, J. C., Westerdahl, A., Conway, P. L., & Kjelleberg, S. (1997). Colonization in the fish intestinal tract and production of

- inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *Journal of Fish Diseases*, 20(5), 383–392. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00316.x>
- Jover, M., García-Gómez, A., Tomás, A., De La Gándara, F., & Pérez, L. (1999). Growth of mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*) fed extruded diets containing different levels of protein and lipid. *Aquaculture*, 179(1–4), 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00149-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00149-0)
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K.-I., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.*, 30(14), 3059–3066.
- Khaoian, P., Nguyen, H. P., Ogita, Y., Fukada, H., & Masumoto, T. (2014). Taurine supplementation and palm oil substitution in low-fish meal diets for young yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*, 420–421, 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.012>
- Khezrian, S., Salati, A. P., Agh, N., & Pasha-Zanoosi, H. (2020). Effect of replacement of fish oil with different plant oils in *Oncorhynchus mykiss* broodstocks diets on egg and larval antioxidant defense development. *Veterinary Research Forum*, 11(1), 83–88. <https://doi.org/10.30466/vrf.2019.92045.2228>
- Kiron, V., Fukuda, H., Takeuchi, T., & Watanabe, T. (1995). Essential fatty acid nutrition and defence mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 111(3), 361–367. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)00042-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)00042-6)
- Kissil, G. W., & Lupatsch, I. (2004). Successful replacement of fishmeal by plant proteins in diets for the gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah*, 56(3), 188–199.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-

- based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1).
<https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Korkea-aho, T. L., Papadopoulou, A., Heikkinen, J., von Wright, A., Adams, A., Austin, B., & Thompson, K. D. (2012). *Pseudomonas* M162 confers protection against rainbow trout fry syndrome by stimulating immunity. *Journal of Applied Microbiology*, 113(1), 24–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05325.x>
- Kozul, V., Skaramuca, B., Glamuzina, N., Glavic, N., & Tutman, P. (2001). Comparative gonadogenesis and hormonal induction of spawning of cultured and wild mediterranean amberjack (*Seriola dumerili*, Risso 1810). *Scientia Marina*, 65(3), 215–220.
- Krogdahl, Å., Bakke-Mckellep, A. M., Rød, K. H., & Bæverfjord, G. (2000). Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: Effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. *Aquaculture Nutrition*, 6(2), 77–84. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2000.00129.x>
- Krogdahl, Å., Hemre, G. I., & Mommsen, T. P. (2005). Carbohydrates in fish nutrition: Digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition*, 11(2), 103–122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x>
- Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., & Bakke, A. M. (2010). Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: An update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*, 41(3), 333–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x>
- Kudo, T. (2009). Termite-microbe symbiotic system and its efficient degradation of lignocellulose. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(12), 2561–2567. <https://doi.org/10.1271/bbb.90304>
- Lau, N. S., Ting, S. Y., Sam, K. K., Janaranjani, M., Wong, S. C., Wu, X., Waiho, K., Fazhan, H., & Shu-Chien, A. C. (2022). Comparative Analyses of *Scylla olivacea* Gut Microbiota Composition and Function Suggest the Capacity for Polyunsaturated Fatty Acid

- Biosynthesis. *Microbial Ecology*.
<https://doi.org/10.1007/s00248-022-02046-0>
- Lavoie, C., Courcelle, M., Redivo, B., & Derome, N. (2018). Structural and compositional mismatch between captive and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) parrs' gut microbiota highlights the relevance of integrating molecular ecology for management and conservation methods. *Evolutionary Applications*, 11(9), 1671–1685. <https://doi.org/10.1111/eva.12658>
- Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., Brinchmann, M. F., & Kiron, V. (2011). In vitro adherence of two candidate probiotics from Atlantic cod and their interference with the adhesion of two pathogenic bacteria. *Veterinary Microbiology*, 148(2–4), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.024>
- Lazzari, A., & Barbera, G. (1988). First data on the fishing of yellowtail (*Seriola dumerili*) spawners in the mediterranean basin. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2(1), 133–142.
- Lazzari, A., Fusari, A., Boglione, C., Marino, G., & Francesc, M. (2000). Recent advances in reproductional and rearing aspects of *Seriola dumerilii*. *Mediterranean Marine Aquaculture FinfishSpecies Diversification, Cahiers Options Méditerranéennes*, 47, 241–247.
- Li, Y., Bruni, L., Jaramillo-Torres, A., Gajardo, K., Kortner, T. M., & Kroghdahl, Å. (2021). Differential response of digesta- and mucosa-associated intestinal microbiota to dietary insect meal during the seawater phase of Atlantic salmon. *Animal Microbiome*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s42523-020-00071-3>
- Liu, S., Wang, S., Cai, Y., Li, E., Ren, Z., & Wu, Y. (2020). Beneficial effects of a host gut-derived probiotic, *Bacillus pumilus*, on the growth, non-specific immune response and disease resistance of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture*, 514(July 2019), 734446. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734446>
- Lu, K. le, Xu, W. N., Wang, L. N., Zhang, D. D., Zhang, C. N., & Liu, W. bin. (2014). Hepatic β -oxidation and regulation of carnitine

- palmitoyltransferase (CPT) I in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed a high fat diet. *PLoS ONE*, 9(3).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093135>
- Lu, S., Zhao, N., Zhao, A., & He, R. (2008). Effect of soybean phospholipid supplementation in formulated microdiets and live food on foregut and liver histological changes of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture*, 278, 119–127.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.007>
- Lyons, P. P., Turnbull, J. F., Dawson, K. A., & Crumlish, M. (2017). Phylogenetic and functional characterization of the distal intestinal microbiome of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from both farm and aquarium settings. *Journal of Applied Microbiology*, 122(2), 347–363.
<https://doi.org/10.1111/jam.13347>
- Magalhães, R., Martins, N., Fontinha, F., Couto, A., Serra, C. R., Santos, R. A., Olsen, R. E., Peres, H., & Oliva-Teles, A. (2022). Effects of dietary ARA, DHA, and carbohydrates levels on gilthead sea bream liver and intestine oxidative stress, tissue histomorphology, and gut microbiota. *Aquaculture*, 552.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738014>
- Marino, G., Mandich, A., Massari, A., Andaloro, F., Porrello, S., Finoia, M. G., & Cerasco, F. (1995). Aspects of reproductive biology of the Mediterranean amberjack (*Seriola dumerilii* Risso) during the spawning period. *Journal of Applied Ichthyology*, 11(1–2), 9–24.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1995.tb00002.x>
- Martin, S. A. M., & Król, E. (2017). Nutrigenomics and immune function in fish: new insights from omics technologies. *Developmental and Comparative Immunology*, 75, 86–98.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.02.024>
- Martínez-Llorens, S., Tomás-Vidal, A., Moñino, A. V., Pla-Torres, M., & Jover Cerdá, M. (2007). Effects of dietary soybean oil concentration on growth, nutrient utilization and muscle fatty

- acid composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, 38(1), 76–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01636.x>
- Martínez-Llorens, S., Vidal, A. T., & Cerdá, M. J. (2012). A new tool for determining the optimum fish meal and vegetable meals in diets for maximizing the economic profitability of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) feeding. *Aquaculture Research*, 43(11), 1697–1709. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02977.x>
- Martínez-Llorens, S., Vidal, A. T., Moñino, A. V., Torres, M. P., & Jover Cerdá, M. (2007). Effects of dietary soybean oil concentration on growth, nutrient utilization and muscle fatty acid composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, 38(1), 76–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01636.x>
- Matulić, D., Barišić, J., Aničić, I., Tomljanović, T., Safner, R., Treer, T., Gao, J., Glojnarić, I., & Čož-Rakovac, R. (2020). Growth, health aspects and histopathology of brown bullhead (*Ameiurus nebulosus* L.): replacing fishmeal with soybean meal and brewer's yeast. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57722-3>
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049–6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T. M., Bøgwald, J., Castex, M., & Ringø, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007>
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R. T. M., & Davies, S. J. (2010). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria.

Aquaculture Nutrition, 16(5), 504–510.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00689.x>

Merrifield, D. L., & Ringø, E. (2014). *Aquaculture Nutrition. Gut Health, Probiotics and Prebiotics*.

Milián-Sorribes, M. C., Martínez-Llorens, S., Cruz-Castellón, C., Jover-Cerdá, M., & Tomás-Vidal, A. (2020). Effect of fish oil replacement and probiotic addition on growth, body composition and histological parameters of yellowtail (*Seriola dumerili*). *Aquaculture Nutrition*, 00(September), 1–14.
<https://doi.org/10.1111/anu.13171>

Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A. K., Kumar, K., Pani Prasad, K., & Mohanta, K. N. (2012). Fenvalerate induced stress mitigation by dietary supplementation of multispecies probiotic mixture in a tropical freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(1), 28–37.
<https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2012.06.006>

Monge-Ortiz, R. (2020). *Efecto de la sustitución de la harina y el aceite de pescado por fuentes vegetales y animales en la alimentación de la seriola (Seriola dumerili. Risso, 1810)*. Universitat Politècnica de València.

Monge-Ortiz, R., Tomás-Vidal, A., Gallardo-Álvarez, F. J., Estruch, G., Godoy-Olmos, S., Jover-Cerdá, M., & Martínez-Llorens, S. (2018). Partial and total replacement of fishmeal by a blend of animal and plant proteins in diets for *Seriola dumerili*: Effects on performance and nutrient efficiency. *Aquaculture Nutrition*, 24(4), 1163–1174. <https://doi.org/10.1111/anu.12655>

Monge-Ortiz, R., Tomás-Vidal, A., Rodríguez-Barreto, D., Martínez-Llorens, S., Pérez, J. A., Jover-Cerdá, M., & Lorenzo, A. (2018). Replacement of fish oil with vegetable oil blends in feeds for greater amberjack (*Seriola dumerili*) juveniles: Effect on growth performance, feed efficiency, tissue fatty acid composition and flesh nutritional value. *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 605–615.
<https://doi.org/10.1111/anu.12595>

- Montero, D., Grasso, V., Izquierdo, M. S., Ganga, R., Real, F., Tort, L., Caballero, M. J., & Acosta, F. (2008). Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Effects on hepatic Mx expression and some immune parameters. *Fish and Shellfish Immunology*, 24(2), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.08.002>
- Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M. J., & Izquierdo, M. S. (2003). Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): Effects on fish health. *Aquaculture*, 225(1–4), 353–370. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00301-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00301-6)
- Montero, D., Tort, L., Izquierdo, M. S., Robaina, L., & Vergara, J. M. (1998). Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream (*Sparus auratus*) caused by a - tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiology and Biochemistry*, 18(4), 399–407.
- Morales, A. E., García-Rejón, L., & de La Higuera, M. (1990). Influence of handling and/or anaesthesia on stress response in rainbow trout. Effects on liver primary metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 95(1), 87–93. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(90\)90014-J](https://doi.org/10.1016/0300-9629(90)90014-J)
- Morales, A. E., Pérez-Jiménez, A., Carmen Hidalgo, M., Abellán, E., & Cardenete, G. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in Dentex dentex liver. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 139(1–3), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.10.008>
- Moroni, F., Naya-Català, F., Piazzon, M. C., Rimoldi, S., Calduch-Giner, J., Giardini, A., Martínez, I., Brambilla, F., Pérez-Sánchez, J., & Terova, G. (2021). The Effects of Nisin-Producing Lactococcus lactis Strain Used as Probiotic on Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Growth, Gut Microbiota, and Transcriptional Response. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.659519>

- Mourente, G., Good, J. E., Thompson, K. D., & Bell, J. G. (2007). Effects of partial substitution of dietary fish oil with blends of vegetable oils, on blood leucocyte fatty acid compositions, immune function and histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *British Journal of Nutrition*, 98(4), 770–779. <https://doi.org/10.1017/S000711450773461X>
- Moutinho, S., Martínez-Llorens, S., Tomás-Vidal, A., Jover-Cerdá, M., Oliva-Teles, A., & Peres, H. (2016). Meat and bone meal as partial replacement for fish meal in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles: Growth, feed efficiency, amino acid utilization, and economic efficiency. *Aquaculture*, 468, 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.024>
- Moutinho, S., Peres, H., Serra, C., Martínez-Llorens, S., Tomás-Vidal, A., Jover-Cerdá, M., & Oliva-Teles, A. (2017). Meat and bone meal as partial replacement of fishmeal in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles: Diets digestibility, digestive function, and microbiota modulation. *Aquaculture*, 479, 721–731. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2017.07.021>
- Mylonas, C. C., Papandroulakis, N., Smboukis, A., Papadaki, M., & Divanach, P. (2004). Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerili*) using GnRHa implants. *Aquaculture*, 237(1–4), 141–154. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2004.04.015>
- Nagel, F., von Danwitz, A., Tusche, K., Kroeckel, S., van Bussel, C. G. J., Schlachter, M., Adem, H., Tressel, R. P., & Schulz, C. (2012). Nutritional evaluation of rapeseed protein isolate as fish meal substitute for juvenile turbot (*Psetta maxima* L.) — Impact on growth performance, body composition, nutrient digestibility and blood physiology. *Aquaculture*, 356–357, 357–364. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2012.04.045>
- Nakada, M. (2000). Yellowtail and related species culture. In *Encyclopedia of aquaculture* (pp. 1007–1036).

- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. In *Aquaculture Research* (Vol. 41, Issue 11, pp. 1553–1573). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>
- Nie, Z., Xu, X., Shao, N., He, J., Li, P., Xu, P., Hu, J., Qin, W., Wang, B., & Xu, G. (2023). Integrative analysis of microbiome and metabolome reveals the linkage between gut microbiota and carp growth. *Environmental Research*, 220, 115133. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2022.115133>
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., & Bylund, G. (2001). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, 198(3–4), 229–236. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00593-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00593-2)
- Nikouli, E., Kormas, K. A., Jin, Y., Olsen, Y., Bakke, I., & Vadstein, O. (2021). Dietary Lipid Effects on Gut Microbiota of First Feeding Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.665576>
- Nimalan, N., Sørensen, S. L., Fečkaninová, A., Koščová, J., Mudroňová, D., Gancarčíková, S., Vatsos, I. N., Bisa, S., Kiron, V., & Sørensen, M. (2023). Supplementation of lactic acid bacteria has positive effects on the mucosal health of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed soybean meal. *Aquaculture Reports*, 28, 101461. <https://doi.org/10.1016/J.AQREP.2022.101461>
- O’Fallon, J. V., Busboom, J. R., Nelson, M. L., & Gaskins, C. T. (2007). A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *Journal of Animal Science*, 85(6), 1511–1521. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-491>
- Oliva-Teles, A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*, 35(2), 83–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x>
- Olsvik, P. A., Torstensen, B. E., & Berntssen, M. H. G. (2007). Effects of complete replacement of fish oil with plant oil on gastrointestinal cell death, proliferation and transcription of eight genes’

- encoding proteins responding to cellular stress in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Journal of Fish Biology*, 71(2), 550–568.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01521.x>
- O'Neill, B., Le Roux, A., & Hoffman, L. C. (2015). Comparative study of the nutritional composition of wild versus farmed yellowtail (*Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 448, 169–175.
<https://doi.org/10.1016/j.AQUACULTURE.2015.05.034>
- Øverland, M., Sørensen, M., Storebakken, T., Penn, M., Krogdahl, Å., & Skrede, A. (2009). Pea protein concentrate substituting fish meal or soybean meal in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*)-Effect on growth performance, nutrient digestibility, carcass composition, gut health, and physical feed quality. *Aquaculture*, 288(3–4), 305–311.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.012>
- Oxley, A., Jolly, C., Eide, T., Jordal, A.-E. O., Svoldal, A., & Olsen, R.-E. (2010). The combined impact of plant-derived dietary ingredients and acute stress on the intestinal arachidonic acid cascade in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *British Journal of Nutrition*, 103, 851–861. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992467>
- Pandey, B. N., Pandey, P. K., Choubey, B. J., & Datta Munshi, J. S. (1976). Studies on blood components of an air-breathing siluroid fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) in relation to body weight. *Folia Haematologica (Leipzig, Germany: 1928)*, 103(1), 101–116.
<http://europepmc.org/abstract/MED/58809>
- Paray, B. A., Hoseini, S. M., Hoseinifar, S. H., & Van Doan, H. (2020). Effects of dietary oak (*Quercus castaneifolia*) leaf extract on growth, antioxidant, and immune characteristics and responses to crowding stress in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 524, 735276.
<https://doi.org/10.1016/j.AQUACULTURE.2020.735276>
- Parma, L., Pelusio, N. F., Gisbert, E., Esteban, M. A., D'Amico, F., Soverini, M., Candela, M., Dondi, F., Gatta, P. P., & Bonaldo, A. (2020). Effects of rearing density on growth, digestive conditions,

- welfare indicators and gut bacterial community of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L. 1758) fed different fishmeal and fish oil dietary levels. *Aquaculture*, 518, 734854. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2019.734854>
- Parrino, V., Kesbiç, O. S., Ümit, A., & Fazio, F. (2019). Hot pepper (*Capsicum sp.*) oil and its effects on growth performance and blood parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Natural Product Research*, 0(0), 1–5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1550769>
- Peng, S., Chen, L., Qin, J. G., Hou, J., Yu, N., Long, Z., Ye, J., & Sun, X. (2008). Effects of replacement of dietary fish oil by soybean oil on growth performance and liver biochemical composition in juvenile black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*. *Aquaculture*, 276(1–4), 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.01.035>
- Peng, X., Li, F., Lin, S., & Chen, Y. (2016). Effects of total replacement of fish oil on growth performance, lipid metabolism and antioxidant capacity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture International*, 24(1), 145–156. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9914-7>
- Peres, H., Santos, S., & Oliva-Teles, A. (2013). Selected plasma biochemistry parameters in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Journal of Applied Ichthyology*, 29(3), 630–636. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2012.02049.x>
- Piazzon, M. C., Naya-Català, F., Perera, E., Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A., & Pérez-Sánchez, J. (2020). Genetic selection for growth drives differences in intestinal microbiota composition and parasite disease resistance in gilthead sea bream. *Microbiome*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00922-w>
- Plaza, I. (2001). Los fitosteroles, el colesterol y la prevención de las enfermedades cardiovasculares. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, 13(5), 209–218. [https://doi.org/10.1016/s0214-9168\(01\)78802-x](https://doi.org/10.1016/s0214-9168(01)78802-x)

- Poortenaar, C. W., Hooker, S. H., & Sharp, N. (2001). Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi lalandi*) reproductive physiology, as a basis for aquaculture development. *Aquaculture*, 201(3–4), 271–286. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00549-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00549-X)
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Ramírez, C., Rojas, R., & Romero, J. (2020). Partial Evaluation of Autochthonous Probiotic Potential of the Gut Microbiota of *Seriola lalandi*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(2), 672–682. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09550-9>
- Ramírez, C., & Romero, J. (2017). The microbiome of *Seriola lalandi* of wild and aquaculture origin reveals differences in composition and potential function. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01844>
- Ramos, M. A., Gonçalves, J. F. M., Batista, S., Costas, B., Pires, M. A., Rema, P., & Ozório, R. O. A. (2015). Growth, immune responses and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) supplemented with commercial probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(1), 19–26. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2015.04.001>
- Reda, R. M., Maricchiolo, G., Quero, G. M., Basili, M., Aarestrup, F. M., Pansera, L., Mirto, S., Abd El-Fattah, A. H., Alagawany, M., & Abdel Rahman, A. N. (2022). Rice protein concentrate as a fish meal substitute in *Oreochromis niloticus*: Effects on immune response, intestinal cytokines, *Aeromonas veronii* resistance, and gut microbiota composition. *Fish & Shellfish Immunology*, 126, 237–250. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2022.05.048>
- Ribeiro, L., Moura, J., Santos, M., Colen, R., Rodrigues, V., Bandarra, N., Soares, F., Ramalho, P., Barata, M., Moura, P., Pousão-Ferreira, P., & Dias, J. (2015). Effect of vegetable based diets on growth, intestinal morphology, activity of intestinal enzymes and

- haematological stress indicators in meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture*, 447, 116–128. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2014.12.017>
- Richard, N., Mourente, G., Kaushik, S., & Corraze, G. (2006). Replacement of a large portion of fish oil by vegetable oils does not affect lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 261(3), 1077–1087. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.021>
- Rola-pleszczynski, M., & Stankova, J. (1992). Leukotriene B4 enhances interleukin-6 (IL-6) production and IL-6 messenger RNA accumulation in human monocytes in vitro : Transcriptional and posttranscriptional mechanisms Leukotriene B4 enhances interleukin-6 (IL-6) production and IL-6 messenger RNA. *Blood*, 80, 1004–1011. <https://doi.org/10.1182/blood.V80.4.1004.bloodjournal8041004>
- Romalde, J. L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. piscicida: An integrated view of a bacterial fish pathogen. In *International Microbiology* (Vol. 5, Issue 1, pp. 3–9). Sociedad Espanola de Microbiologia. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0051-6>
- Sáenz De Rodrigáñez, M. A., Díaz-Rosales, P., Chabrilón, M., Smidt, H., Arijó, S., León-Rubio, J. M., Alarcón, F. J., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., Cara, J. B., & Moyano, F. J. (2009). Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition*, 15(2), 177–185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00581.x>
- Sahlmann, C., Sutherland, B. J. G., Kortner, T. M., Koop, B. F., Krogdahl, Å., & Bakke, A. M. (2013). Early response of gene expression in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during the development of soybean meal induced enteritis. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(2), 599–609. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2012.11.031>

- Salas-Leiva, J., Mazón-Suástegui, J. M., Teles, A., & Tovar-Ramírez, D. (2020). Structure and predictive metabolic contribution of intestinal microbiota of Longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) juveniles in aquaculture systems. *Molecular Biology Reports*, 47(12), 9627–9636. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05970-x>
- Sales, J., & Glencross, B. (2011). A meta-analysis of the effects of dietary marine oil replacement with vegetable oils on growth, feed conversion and muscle fatty acid composition of fish species. *Aquaculture Nutrition*, 17, 271–287. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00761.x>
- Salze, G., McLean, E., Battle, P. R., Schwarz, M. H., & Craig, S. R. (2010). Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 298(3–4), 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.003>
- Sánchez Lozano, N. B., Tomás Vidal, A., Martínez-Llorens, S., Nogales Mérida, S., Blanco, J. E., Moñino López, A., Pla Torres, M., & Cerdá, M. J. (2007). Growth and economic profit of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed sunflower meal. *Aquaculture*, 272(1–4), 528–534. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.221>
- Sánchez-Lozano, N. B., Martínez-Llorens, S., Tomás-Vidal, A., & Cerdá, M. J. (2009). Effect of high-level fish meal replacement by pea and rice concentrate protein on growth, nutrient utilization and fillet quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture*, 298(1–2), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.09.028>
- Santigosa, E., Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., & Gallardo, M. A. (2008). Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture*, 282(1–4), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.007>

- Sarih, S., Djellata, A., Roo, J., Hernández-Cruz, C. M., Fontanillas, R., Rosenlund, G., Izquierdo, M., & Fernández-Palacios, H. (2019). Effects of increased protein, histidine and taurine dietary levels on egg quality of greater amberjack (*Seriola dumerili*, Risso, 1810). *Aquaculture*, 499, 72–79. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.09.011>
- Seno-o, A., Takakuwa, F., Hashiguchi, T., & Morioka, K. (2008). Replacement of dietary fish oil with olive oil in young yellowtail *Seriola quinqueradiata*: effects on growth, muscular fatty acid composition and prevention of dark muscle discoloration during refrigerated storage. *Fisheries Sciences*, 74, 1297–1306. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2008.01655.x>
- Seong, T., Matsuyoshi, J., Haga, Y., Kabeya, N., Kitagima, R., Miyahara, J., Koshiishi, T., & Satoh, S. (2022). Utilization of microalgae *Schizochytrium* sp. in non-fish meal, non-fish oil diet for yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture Research*, 53(5), 2042–2052. <https://doi.org/10.1111/are.15732>
- Serradell, A., Torrecillas, S., Makol, A., Valdenegro, V., Fernández-Montero, A., Acosta, F., Izquierdo, M. S., & Montero, D. (2020). Prebiotics and phytogenics functional additives in low fish meal and fish oil based diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Effects on stress and immune responses. *Fish and Shellfish Immunology*, 100, 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.016>
- Shinn, A. P., Pratoomyot, J., Bron, J. E., Paladini, G., Brooker, E. E., & Brooker, A. J. (2015). Economic costs of protistan and metazoan parasites to global mariculture. *Parasitology*, 142(1), 196–270. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001437>
- Sicuro, B., & Luzzana, U. (2016). The State of *Seriola* spp. Other Than Yellowtail (*S. quinqueradiata*) Farming in the World. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 24(4), 314–325. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1187583>

- Silva, F. C. de P., Nicoli, J. R., Zambonino-Infante, J. L., Kaushik, S., & Gatesoupe, F.-J. (2011). Influence of the diet on the microbial diversity of faecal and gastrointestinal contents in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*). *FEMS Microbiology Ecology*, 78(2), 285–296. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01155.x>
- Singh, A., Faber Hammond, J. J., O'Rourke, C. F., & Renn, S. C. P. (2019). Gut microbial diversity increases with social rank in the African cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*. *Animal Behaviour*, 152, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.ANBEHAV.2019.04.003>
- Sitjà-Bobadilla, A., Peña-Llopis, S., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., & Pérez-Sánchez, J. (2005). Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 249(1–4), 387–400. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.031>
- Son, V. M., Chang, C. C., Wu, M. C., Guu, Y. K., Chiu, C. H., & Cheng, W. (2009). Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(5), 691–698. <https://doi.org/10.1016/j.FSI.2009.02.018>
- Soriano, E. L., Ramírez, D. T., Araujo, D. R., Gómez-Gil, B., Castro, L. I., & Sánchez, C. G. (2018). Effect of temperature and dietary lipid proportion on gut microbiota in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* juveniles. *Aquaculture*, 497, 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.AQUACULTURE.2018.07.065>
- Spinelli, J., Houle, C., & Wekell, J. (1983). The effect of phytates on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed purified diets containing varying quantities of calcium and magnesium. *Aquaculture*, 30, 71–83.
- Stuart, K. R., Barrows, F. T., Silbernagel, C., Alfrey, K., Rotstein, D., & Drawbridge, M. A. (2021). Complete replacement of fish oil and

- fish meal in the diet of juvenile California yellowtail *Seriola dorsalis*. *Aquaculture Research*, 52(2), 655–665. <https://doi.org/10.1111/are.14923>
- Tachihara, K., Tukashima, Y., & Ebisu, R. (1993). Spawning, Eggs, Larvae and Juveniles of the Purplish Amberjack *Seriola dumerili*. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI*, 59(9), 1479–1488. <https://doi.org/10.2331/SUISAN.59.1479>
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., & Nishijima, M. (2014). Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105592>
- Takakuwa, F., Fukada, H., Hosokawa, H., & Masumoto, T. (2006). Optimum digestible protein and energy levels and ratio for greater amberjack *Seriola dumerili* (Risso) fingerling. *Aquaculture Research*, 37(15), 1532–1539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01590.x>
- Takakuwa, F., Suzuri, K., Horikawa, T., Nagahashi, K., Yamada, S., Biswas, A., & Tanaka, H. (2019). Availability of potato protein concentrate as an alternative protein source to fish meal in greater amberjack (*Seriola dumerili*) diets. *Aquaculture Research*, 51. <https://doi.org/10.1111/are.14480>
- Tan, X., Sun, Z., Liu, Q., Ye, H., Zou, C., Ye, C., Wang, A., & Lin, H. (2018). Effects of dietary ginkgo biloba leaf extract on growth performance, plasma biochemical parameters, fish composition, immune responses, liver histology, and immune and apoptosis-related genes expression of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂ × *Epinephelus fuscoguttatus*♀) fed high lipid diets. *Fish and Shellfish Immunology*, 72, 399–409. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.022>
- ten Doeschate, K. I., & Coyne, V. E. (2008). Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture*,

- 284(1–4), 174–179.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.018>
- Thanuthong, T., Francis, D. S., Senadheera, S. D., Jones, P. L., & Turchini, G. M. (2011). Fish oil replacement in rainbow trout diets and total dietary PUFA content: I) Effects on feed efficiency, fat deposition and the efficiency of a finishing strategy. *Aquaculture*, 320(1–2), 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.007>
- Tomás-Vidal, A., De La Gándara, F., García-Gomez, A., Pérez, L., Jover, M., De La Gándara, F., García-Gomez, A., Pérez, L., & Jover, M. (2005). Utilization of soybean meal as an alternative protein source in the Mediterranean yellowtail, *Seriola dumerili*. *Aquaculture Nutrition*, 11(5), 333–340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2005.00365.x>
- Tomás-Vidal, A., De La Gándara García, F., García-Gómez, A., & Jover-Cerdá, M. (2008). Effect of the protein/energy ratio on the growth of Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerili*). *Aquaculture Research*, 39(11), 1141–1148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01975.x>
- Torrecillas, S., Mompel, D., Caballero, M. J., Montero, D., Merrifield, D., Rodiles, A., Robaina, L., Zamorano, M. J., Karalazos, V., Kaushik, S., & Izquierdo, M. (2017). Effect of fishmeal and fish oil replacement by vegetable meals and oils on gut health of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 468, 386–398. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2016.11.005>
- Torstensen, B. E., Øyvind, L., & Frøyland, L. (2000). Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) - Effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. *Lipids*, 35(6), 653–664. <https://doi.org/10.1007/s11745-000-0570-6>
- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1366–1375. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2011.07.002>

- Trevi, S., Uren Webster, T. M., & Consuegra, S. (2023). *Effects of micro-algae oil replacement on growth, omega-3 deposition and gut microbiome composition of Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2920591/v1>
- Turchini, G. M., Ng, W., & Tocher, D. (2011). Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. *CRC Press Boca Raton*.
- Turchini, G. M., Torstensen, B. E., & Ng, W. K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 10–57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>
- Uhing, R. J., Cowlen, M. S., & Adams, D. O. (1990). Chapter 14 Mechanisms Regulating the Production of Arachidonate Metabolites in Mononuclear Phagocytes. In A. Kleinzeiler, S. Grinstein, & O. D. B. T.-C. T. in M. and T. Rotstein (Eds.), *Mechanisms of Leukocyte Activation* (Vol. 35, pp. 349–374). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0070-2161\(08\)60086-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0070-2161(08)60086-6)
- Urán, P. A., Gonçalves, A. A., Taverne-Thiele, J. J., Schrama, J. W., Verreth, J. A. J., & Rombout, J. H. W. M. (2008). Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 25(6), 751–760. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.02.013>
- Vandeputte, C., Guizon, I., Genestie-Denis, I., Vannier, B., & Lorenzon, G. (1994). A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biology and Toxicology*, 10(5), 415–421. <https://doi.org/10.1007/BF00755791>
- Wang, C., Liu, Y., Sun, G., Li, X., & Liu, Z. (2019). Growth, immune response, antioxidant capability, and disease resistance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed *Bacillus velezensis* V4 and *Rhodotorula mucilaginosa* compound. *Aquaculture*, 500, 65–74. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.09.052>

- Wang, L., Ge, C., Wang, J., Dai, J., Zhang, P., & Li, Y. (2017). Effects of different combinations of *Bacillus* on immunity and antioxidant activities in common carp. *Aquaculture International*, 25(6), 2091–2099. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0175-5>
- Watanabe, T., Verakunpiriya, V., Mushiake, K., Kawano, K., & Hasegawa, I. (1996). The First Spawn-taking from Broodstock Yellowtail Cultured with Extruded Dry Pellets. *Fisheries Science*, 62(3), 388–393. <https://doi.org/10.2331/FISHSCI.62.388>
- Wu, C.-H., Hsueh, Y.-H., Kuo, J.-M., & Liu, S.-J. (2018). Characterization of a Potential Probiotic *Lactobacillus brevis* RK03 and Efficient Production of γ -Aminobutyric Acid in Batch Fermentation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 143. <https://doi.org/10.3390/ijms19010143>
- Xu, H., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Wang, J., Ma, H., Zhang, W., Wang, X., & Liufu, Z. (2010). Effects of dietary arachidonic acid on growth performance, survival, immune response and tissue fatty acid composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture*, 307(1–2), 75–82. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2010.07.001>
- Xu, H., Dong, X., Zuo, R., Mai, K., & Ai, Q. (2016). Response of juvenile Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) to different dietary fatty acid profiles: Growth performance, tissue lipid accumulation, liver histology and flesh texture. *Aquaculture*, 461, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.023>
- Yang, G., Cao, H., Jiang, W., Hu, B., Jian, S., Wen, C., Kajbaf, K., Kumar, V., Tao, Z., & Peng, M. (2019). Dietary supplementation of *Bacillus cereus* as probiotics in Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze): Effects on growth performance, fillet quality, serum biochemical parameters and intestinal histology. *Aquaculture Research*, 50, 2207–2217. <https://doi.org/10.1111/are.14102>
- Zha, Y., Eiler, A., Johansson, F., & Svanbäck, R. (2018). Effects of predation stress and food ration on perch gut microbiota. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0400-0>

- Zhang, M., Sun, Y., Chen, K., Yu, N., Zhou, Z., Chen, L., Du, Z., & Li, E. (2014). Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture*, 434, 449–455. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2014.09.008>
- Zhang, Z., Xi, L., Liu, H., Jin, J., Yang, Y., Zhu, X., Han, D., & Xie, S. (2022). High replacement of fishmeal by Chlorella meal affects intestinal microbiota and the potential metabolic function in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1016662>
- Zhou, Z., Yao, W., Ye, B., Wu, X., Li, X., & Dong, Y. (2020). Effects of replacing fishmeal protein with poultry by-product meal protein and soybean meal protein on growth, feed intake, feed utilization, gut and liver histology of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) juveniles. *Aquaculture*, 516(June 2019). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734503>