



UNIVERSIDAD DE MURCIA

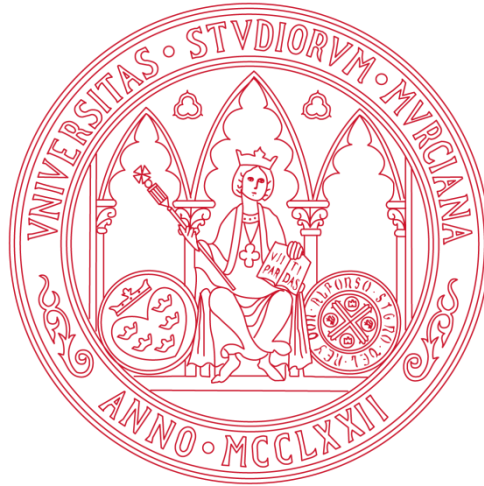
FACULTAD DE MEDICINA

Effects of excedent commercial feed consumption on fatty acid profile from marine fauna aggregated to fish farms

Efectos del consumo de pienso comercial excedente en el perfil de ácidos grasos de la fauna marina agregada a piscifactorías

D. Daniel González Silvera

2015



Effects of excedent commercial feed consumption on fatty acid profile from marine fauna aggregated to fish farms

Daniel González Silvera

Supervisors:

José Ángel López Jiménez

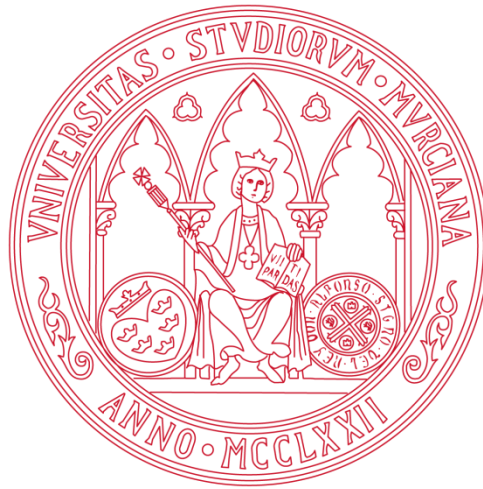
Francisco Javier Martínez López

Departament of Physiology

Faculty of Biology

University of Murcia

2015



Efectos del consumo de pienso comercial excedente en el perfil de ácidos grasos de la fauna marina agregada a piscifactorías

Daniel González Silvera

Directores:

José Ángel López Jiménez

Francisco Javier Martínez López

Departamento de Fisiología

Facultad de Biología

Universidad de Murcia

2015

Index

List of abbreviations	12
Introduction	16
1. Aquaculture: A brief history and current status	19
2. Fatty acids	20
2.1 Structure and nomenclature	20
2.2 Fatty acids biosynthesis.....	24
2.3 Fatty acid catabolism.....	26
3. Lipid classes	29
3.1 Triacylglycerols	29
3.2 Phosphoglycerides	29
3.3 Sphingolipids	29
3.4 Wax esters	30
3.5 Sterols.....	30
4. Functions of fatty acids	30
4.1 Energy, development and reproduction	30
4.2 Membrane and environment adaptation	30
4.3 Eicosanoids and immune functions.....	31
4.4 Cell messengers.....	33
5. Vegetable oils in fish feeds: Environmental impacts of sea-cage fish farms	34
5.1 Effects on water and sediment quality	34
5.2 Effects on health and physiology in wild fauna.....	36
5.3 Fatty acids as markers to trace trophic relationships	37
5.4 Use of fatty acids to track changes in wild fish natural diets.....	38
Objectives.....	42
Experimental chapters	46
Chapter 1.....	48
1. Introducción	50
2. Material y métodos	53
2.1 Animales y dietas.....	53
2.2 Diseño experimental	53
2.3 Recolección de muestras.....	53
2.4 Crecimiento	54

2.5 Determinación del perfil de ácidos grasos de los distintos tejidos	54
2.6 Clases lipídicas	55
2.7 Histología del hígado	55
2.8 Análisis estereológico	55
2.9 Análisis estadístico	56
3. Resultados	57
3.1 Crecimiento	57
3.2 Composición de las dietas	57
3.3 Los niveles de ácidos grasos en músculo, cerebro e hígado reflejaron el cambio de dieta.....	58
3.4 Distribución del perfil de ácidos grasos.....	59
3.5 Clases lipídicas.....	63
3.6 Histología del hígado.....	65
4. Discusión	68
5. Conclusión	75
Agradecimientos	76
Chapter 2.....	78
1. Introduction.....	80
2. Material and methods.....	82
2.1 Tissue sampling	82
2.2 RNA extraction	82
2.3 RNA reverse transcription	83
2.4 PCR reactions and DNA purification.....	83
3. Results and discussion.....	85
Acknowledgements.....	93
Chapter 3.....	94
1. Introducción	96
2. Material y métodos	99
2.1 Mantenimiento de los peces.....	99
2.2 Diseño experimental	99
2.3 Recolección de muestras.....	99
2.4 Crecimiento	100
2.5 Determinación del perfil de ácidos grasos del músculo.....	100
2.6 Parámetros inmunológicos	101

2.7 Análisis estadístico	104
3. Resultados	106
3.1 Perfil de ácidos grasos de las dietas	106
3.2 Crecimiento	106
3.3 Los porcentajes de ácidos grasos del músculo reflejaron el cambio de dieta	106
3.4 Parámetros de la inmunidad innata humoral	109
3.5 Parámetros de la inmunidad celular innata	110
3.6 Correlaciones entre ácidos grasos y parámetros inmunológicos	111
4. Discusión	112
5. Conclusión	118
Agradecimientos	119
Chapter 4.....	120
1. Introducción	122
2. Material y métodos	125
2.1 Características de las especies estudiadas	125
2.2 Diseño experimental	125
2.3 Toma de muestras	126
2.4 Análisis de ácidos grasos	127
2.5 Histología de las gónadas	127
2.6 Análisis estereológico	129
2.7 Análisis estadístico	129
3. Resultados	130
3.1 Condición corporal	130
3.2 Perfil de ácidos grasos de los piensos y las heces	130
3.3 Perfil de ácidos grasos de los diferentes tejidos	130
3.4 Histología de la gónada	131
4. Discusión	138
5. Conclusión	145
Agradecimientos	146
Chapter 5.....	148
1. Introduction.....	150
2. Material and methods.....	152
2.1 Study site and field sampling	152
2.2 Fatty acid analysis.....	153

2.3 Fatty acid markers	154
2.4 Statistical analysis.....	154
3. Results	156
3.1 Collected samples.....	156
3.2 Fatty acid composition of feed and faeces	156
3.3 Fatty acid composition of sediments and seaweeds	156
3.4 Comparison of the populations of both impact and control fish farms.....	157
3.5 Fish feed consumption indices	160
4. Discussion.....	162
5. Conclusions.....	166
Acknowledgements.....	167
General discussion	168
Conclusions	174
Supplementary material: Chapter 1.....	178
Supplementary material: Chapter 3.....	184
Supplementary material: Chapter 4.....	187
Supplementary material: Chapter 5.....	192
References.....	203
Resumen en español	231

List of abbreviations

6FAD	$\Delta 6$ desaturase
ACS	Acyl-CoA synthetase
bp	base pairs
CAP	Ceramide-activated protein kinase
CAT	Carnitine:acylcarnitine translocase
CoA	Coenzyme A
COX	Cyclooxygenase
cPLA₂	Cytosolic phospholipase A ₂
CPT I	Carnitine palmitoyl transferase I
CPT II	Carnitine palmitoyl transferase II
DAG	Diacylglycerol
Elovl	Fatty acid elongase
FA	Fatty acid
FAD	Fatty acyl desaturase
FADs	Fish aggregation devices
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FAS	Fatty acid synthetase complex
GPCRs	G protein-coupled receptors
HUFA	Highly unsaturated fatty acids
IκB	Inhibitory subunit of NF κ B
LOX	Lipoxygenase
LT	Leukotriene
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK	Phosphoinositide-dependent protein kinase
PG	Prostaglandine
PIP₂	Phosphatidylinositol biphosphate
PIP₃	Phosphatidylinositol triphosphate
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PKB	Proto-oncogenic protein kinase
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptors
RT-qPCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
SMase	Sphingomyelinase
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
Ta	Annealing temperature
TL	Total lipids
TX	Thromboxane

Introduction

“Aquaculture is the farming of aquatic organisms, including fish, mollusc, crustaceans and aquatic plants. Farming implies some form of intervention in the rearing process to enhance production, such as regular stocking, feeding, protection from predators, etc. Farming also implies individual or corporate ownership of the stock being cultivated. For statistical purposes, aquatic organisms which are harvested by an individual or corporate body which has owned them throughout their rearing period contribute to aquaculture, while aquatic organisms which are exploitable by the public as a common property resources, with or without appropriate licences, are the harvest of fisheries”

FAO definition of Aquaculture.

1. Aquaculture: A brief history and current status

Fish farming activities are thought to begin in China (Rabanal 1988), around 2000 B.C., rearing common carp *Cyprinus carpio* in ponds. During the last 2000 years, several aquaculture practices have been recorded in several parts of the world, ensuring fish stock for human consumption. Nevertheless, the 20th century has been the main period of worldwide aquaculture expansion, thanks to the improvements of technology and communications. At the same time, world fish demands have increased enormously in the last decades due to the rapid growth of the human population, together with a generalized knowledge of the health benefits provided by fish and sea-food (Stickney and Treece 2012). Currently, aquaculture supplies half of the world fish food, and it is expected to still growing, exceeding the fish food obtained by fisheries.

Unfortunately, the fast development on aquaculture industry has been accompanied by a decline in fisheries captures, due to widespread unsustainable fishing practices (FAO <http://www.fao.org/focus/e/fisheries/challeng.htm>, accessed July 2015). Approximately, half of the major fish stocks are fully exploited since 1990s, and overfishing may lead to a decrease in fish catches. Cultured fish are mainly carnivorous species which require fish meal and fish oils in their diet, contributing to the depletion of the natural resources and transforming aquaculture in a non-sustainable activity. For example, it was necessary up to 5kg of fish meal to produce 1kg of carnivorous fish (Naylor et al. 2000). The massive use of fish oils in fish feeds was also followed by a subsequent increase in fish oils cost. For this reason, a huge effort investigating new protein and oil sources for fish feed has been made in the last decades, with the purpose of avoid an excessive pressure of fishing grounds and get a more sustainable and economical aquaculture practices. Several types of vegetables oils such as canola, rapeseed, linseed, sunflower, soy or palm, have been demonstrated to be adequate, as their production is high enough to meet the aquaculture demands with relative low prices (Watanabe 2002; Naylor et al. 2009). Partial substitution of fish meal by vegetable oils and proteins has been demonstrated to not compromise cultured fish growth, although each species support a different degree of fish meal substitution (Tocher 2010). The high efforts employed in aquaculture research have lead to the development of an efficient growth of a wide number of species and year by year, aquaculture production have increased, reaching the amounts of 66.6 million tonnes in 2012 (Table 1) (FAO 2014).

Nowadays, aquaculture industry offers quality products at competitive prices, although the lipid composition of the cultured fish tend to remain different than the wild counterparts, as the use of vegetable oils in aquafeeds composition alters the natural fatty acid profile of the fish flesh. Nevertheless, this is not the case of all cultured species, as a wide range of research has been made in very economically important fish species, being the flesh richer in some n-3 fatty acids, which present beneficial effects for human health, although there are contradictory results in the effects on organoleptic properties and consumers preferences (Rosenlund et al 2010). High efforts are being made to improve the lipid profile of cultured fishes without compromising fisheries sustainability (Betancor et al. 2015; Turchini et al. 2009). Environmental and physiological implications of current feed lipid compositions will be discussed along this thesis research.

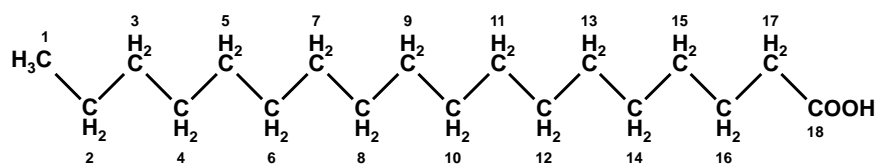
Table 1. World fisheries and aquaculture production (million tonnes) (adapted from FAO 2014).

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Capture						
Inland	10.1	10.3	10.5	11.3	11.1	11.6
Marine	80.7	79.9	79.6	77.8	82.6	79.7
Total capture	90.8	90.1	90.1	89.1	93.7	91.3
Aquaculture						
Inland	29.9	32.4	34.3	36.8	38.7	41.9
Marine	20.0	20.5	21.4	22.3	23.3	24.7
Total aquaculture	49.9	52.9	55.7	59.0	62.0	66.6
Total world fisheries	140.7	143.1	145.8	148.1	155.7	158.0

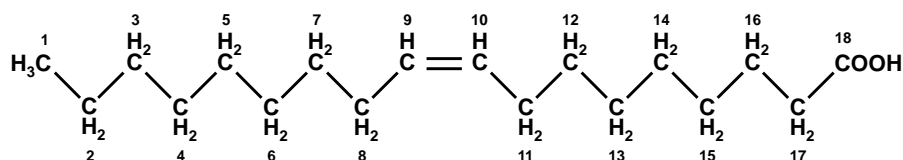
2. Fatty acids

2.1 Structure and nomenclature

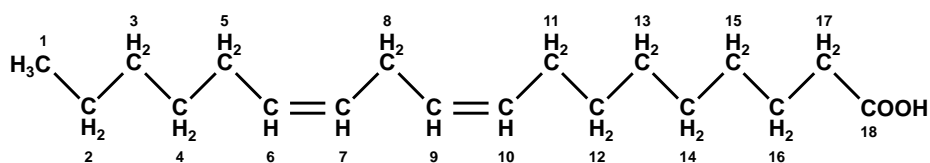
Fatty acids are bipolar or amphipathic carbon chains, with one hydrophilic (-COOH) and hydrophobic (-CH₃) end. They are classified in terms of their number of ethylenic – or double– bonds, in three main classes: a) Saturated fatty acids, with no ethylenic bonds; b) monounsaturated fatty acids, with one ethylenic bond; c) polyunsaturated fatty acids, with two or more ethylenic bonds (Figure 1).



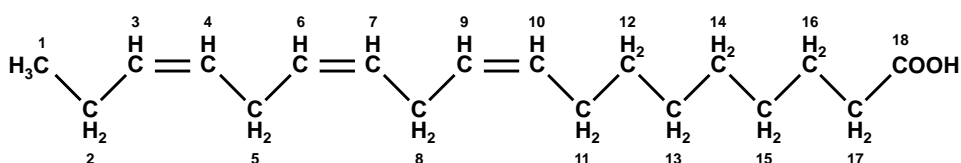
18:0



18:1n-9



18:2n-6



18:3n-3

Figure 1. Saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acyl chains from n-3 and n-6 series of 18 carbon atoms length (redrawn from Tocher 2003).

Fatty acids are termed in function of their number of carbon atoms, the degree of unsaturation (number of ethylenic bonds) and the position of those ethylenic bonds (Sargent et al. 2002; Tocher 2003) (Figure 2). In this manner, 20:0 is a fatty acid composed of 20 carbon atoms and no ethylenic bonds, and 20:1n-9 is a fatty acid composed of 20 carbon atoms and one ethylenic bond, which is located 9 carbons from the methyl end. In the same way, 18:3n-3 and 18:4n-3 consist in 18 carbon atoms, with three and four ethylenic bonds respectively, and in both cases, the first ethylenic bond is 3 carbons from the methyl end.

X:Yn-Z

Figure 2. The most common fatty acid nomenclature in scientific literature:

X represents the number of carbon atoms; Y represents the number of double or ethylenic bonds; Z represents the position of the first ethylenic bond from the methyl end (Naylor et al. 2009).

Although this is the most common way to name the fatty acids, other nomenclatures also exist, using the symbol Δ to identify the position of the first and subsequent ethylenic bonds from the carboxyl end of the acyl chain. In this way, 20:1n-9 is designated as 20:1 Δ 11 and 18:3n-3 as 18:3 Δ 9,12,15 (Table 2).

Table 2. Summary of the fatty acids nomenclature and bonds position.

Vernacular name	Systematic name	n-	Δ
Miristic acid	Tetradecanoic acid	14:0	14:0
	Pentadecanoic acid	15:0	15:0
Palmitic acid	Hexadecanoic acid	16:0	16:0
Palmitoleic acid	9-hexadecenoic acid	16:1n-7	16:1 Δ 9
Stearic acid	Octadecanoic acid	18:0	18:0
Oleic acid	9-octadecenoic acid	18:1n-9	18:1 Δ 9
Vaccenic acid	11-octadecenoic acid	18:1n-7	18:1 Δ 11
linoleic acid	9,12-octadecadienoic acid	18:2n-6	18:2 Δ 9,12
α -linolenic acid	9,12,15-octadecatrienoic acid	18:3n-3	18:3 Δ 9,12,15
γ -linolenic acid	6,9,12-octadecatrienoic acid	18:3n-6	18:3 Δ 6,9,12
Stearidonic acid	6,9,12,15-octadecatetraenoic acid	18:4n-3	18:4 Δ 6,9,12,15
Arachidic acid	Eicosanoic acid	20:0	20:0
Gadoleic acid	9-eicosenoic acid	20:1n-11	20:1 Δ 9
Gondoic acid	11-eicosenoic acid	20:1n-9	20:1 Δ 11
Dihomo- γ -linolenic acid	8,11,14-eicosatrienoic acid	20:3n-6	20:3 Δ 8,11,14
Arachidonic acid	5,8,11,14-eicosatetraenoic acid	20:4n-6	20:4 Δ 5,8,11,14
Timnodonic acid	5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid	20:5n-3	20:5 Δ 5,8,11,14,17
Behenic acid	Docosanoic acid	22:0	22:0
Cetoleic acid	11-docosenoic acid	22:1n-11	22:1 Δ 11
Erucic acid	13-docosenoic acid	22:1n-9	22:1 Δ 13
Adrenic acid	7,10,13,16-docosatetraenoic acid	22:4n-6	22:4 Δ 7,10,13,16
Docosapentaenoic acid	4,7,10,13,16-docosapentaenoic acid	22:5n-6	22:5 Δ 4,7,10,13,16
Clupanodonic acid	7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid	22:5n-3	22:5 Δ 7,10,13,16,19
Cervonic acid	4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid	22:6n-3	22:6 Δ 4,7,10,13,16,19
Nervonic acid	15-tetracosenoic acid	24:1n-9	24:1n Δ 15

Usually, the double bonds in fish fatty acids take place in the *cis* configuration (*trans* configuration can also occur, although it is less common) (Figure 3). Polyunsaturated fatty acids always have one methylene group between two ethylenic bonds, hence, the entire structure of the molecule can be extrapolated just specifying the position of the first ethylenic bond from the methyl end. For example, 20:4n-6 presents four ethylenic bonds, being the first one 6 carbons from the methyl end and 14 carbons from the carboxyl end, which corresponds to 20:4 Δ 5,8,11,14. Although the “ Δ ” nomenclature is more complete, the simplicity of the “n-” nomenclature makes it the most suitable and common in the literature. Nevertheless, the “ Δ ” nomenclature is the preferred one in relation to enzymes implicated in fatty acid metabolism, as these enzymes are generally accepted to recognize the carboxyl end and counting from this point to add double bonds to the chain (for example the enzyme Δ 6 desaturase, which place the first double bond 6 carbons from the carboxyl end). In any case, fatty acids present a vernacular name which is derived from their first source of isolation, being oleic acid (18:1n-9) derived from olive oil, or palmitic acid (16:0) from palm oil; and a Greek-Latin name which gives information about the number of carbons and ethylenic bonds, as docosahexaenoic acid (22:6n-3).

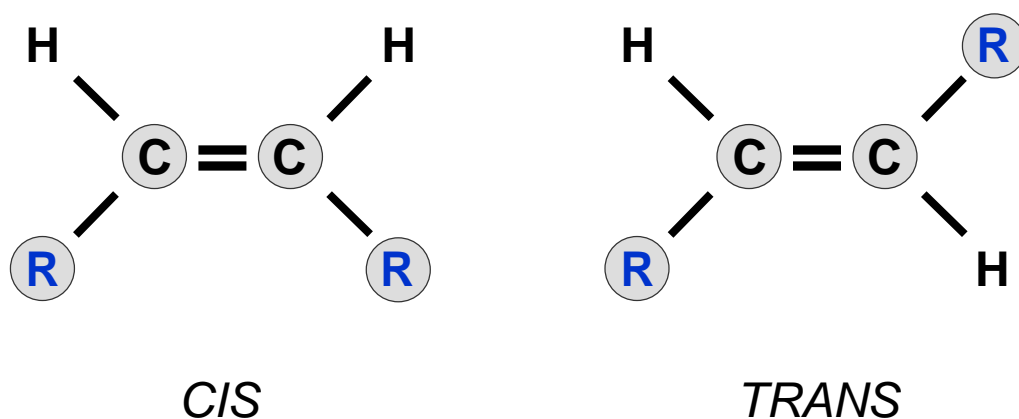


Figure 3. The ethylenic bonds of almost unsaturated fatty acids in the nature are present in *cis* configuration, which causes a rigid deviation of the acyl chain. The obtained angle interferes in the establishment of van der Waals interactions within the fatty acid molecules, thus unsaturated fatty acids tend to remain in liquid phase (oils) while saturated fatty acids remain in solid phase (fats) at room temperature.

2.2 Fatty acids biosynthesis

All known organisms are able to synthesize *de novo* the saturated fatty acids 16:0 and 18:0, which are major components of the cell membranes. In animals, including fish, 16:0 and 18:0 are generated by the fatty acid synthetase (FAS) complex, using mitochondrial acetyl-CoA as source of carbon, and it has been also characterized in fish (Sargent et al. 2002). Eight units of two carbon atoms are required for the synthesis of 16:0, one of them being acetyl-CoA which serve as primer, and the other seven are acetyl units that are carboxylated to malonyl-CoA (Tocher 2003). A sucesive steps of condensation reactions are carried out by FAS using NADPH, where the saturated acyl chain product from one cycle is utilized as a primer substrate for the next cycle (Rangan and Smith 2002). Fish and many eukaryotic organisms are able to elongate in two-carbon units the fatty acids endogenously synthesized and those from the diet (Cook and McMaster 2002).

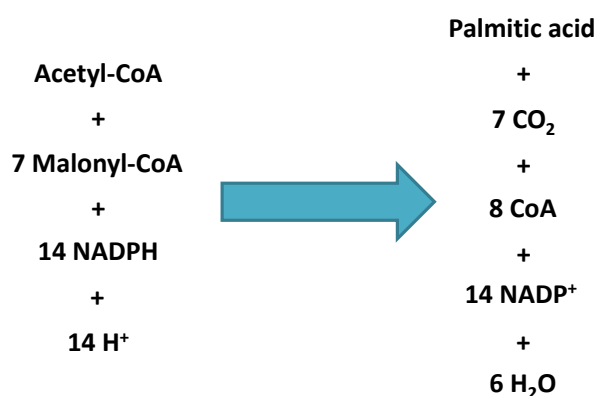


Figure 4. Equation that summarizes the overall reaction catalyzed by the animal FAS.

The 16:0 and 18:0 can be desaturated by a Δ^9 -desaturase to form 16:1n-7 and 18:1n-9 respectively (Figure 5). The synthesis of 18:2n-6 and 18:3n-3 require the function of Δ^{12} and Δ^{15} desaturases, which are not present in vertebrates (Figure 6), so 18:2n-6 and 18:3n-3 are considered essential fatty acids and must be incorporated from the diet. Several desaturases and elongases participate in the successive steps to get long-chain polyunsaturated fatty acids. These reactions take place in the cytosol, except for 22:6n-3, which do not occur by direct desaturation from 22:5n-3. However, it is elongated and desaturated to 24:6n-3 followed by a chain shortening step in the peroxisomes (Sprecher et al. 1995). In any case, there are some controversies in this process, being possible in some species a direct desaturation step via Δ^4 desaturase (Qiu 2003; Tocher 2015).

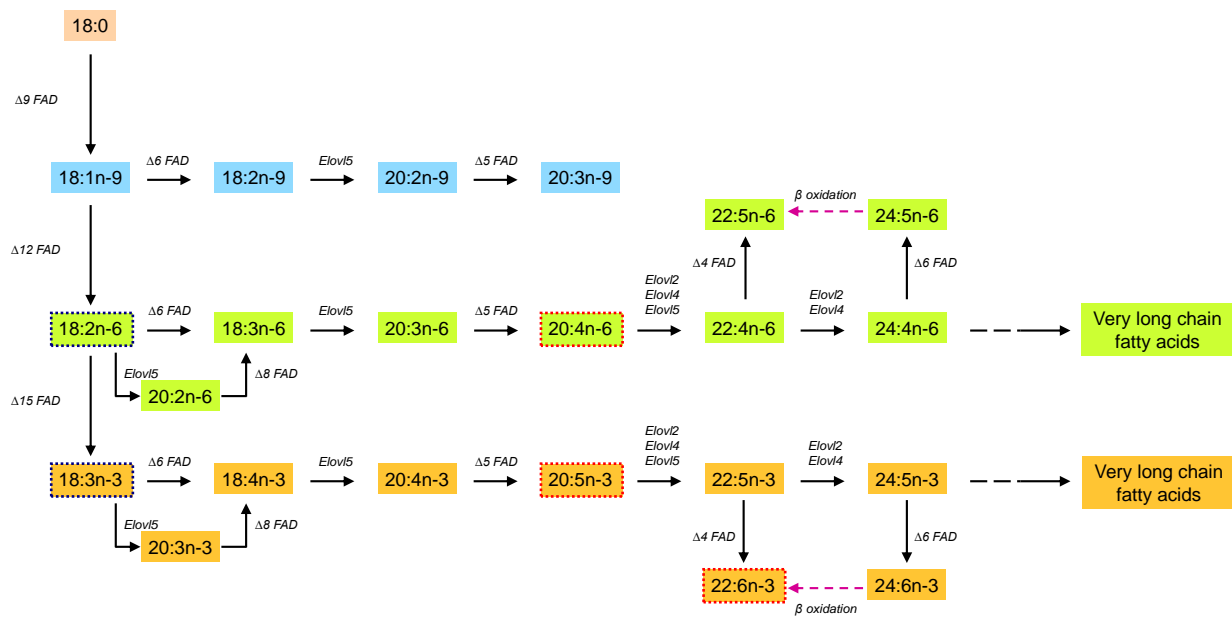


Figure 5. General pathway of desaturation and elongation of fatty acids (modified from [Tocher 2015](#)).

Δ4FAD, Δ5FAD, Δ6FAD and Δ8FAD: Fatty acyl desaturases; Elov12, Elov14 and Elov15: Fatty acid elongases.

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> n-9 fatty acid series n-6 fatty acid series n-3 fatty acid series | <ul style="list-style-type: none"> Essential fatty acids for vertebrates, including teleost fish Essential fatty acids for carnivorous marine fish |
|--|---|

The last product of the desaturation and elongation of 18:1n-9 is 20:3n-9, and the enzymes involved in these steps are the same that participate in the production of the n-3 and n-6 fatty acid series from 18:3n-3 and 18:2n-6 respectively. Nevertheless, the affinity of the enzymes is different for each group of fatty acids, in the order n-3 > n-6 > n-9. This fact entails that just in the absence of 18:2n-6 and 18:3n-3, the enzymes will act on 18:1n-9, thus 20:3n-9 will be present only when severe deficiencies in the essential fatty acids occur in the diet. Freshwater fish are able to carry out the forementioned conversions to get the long-chain polyunsaturated fatty acids 20:4n-6, 20:5n-3 and 22:6n-3, necessary for a number of physiological functions. Notwithstanding, marine fish in general, and especially carnivorous fish, present a reduced or have lost the ability of desaturate and elongate 18:2n-6 and 18:3n-3 to their higher final products. A possible explanation could be the fact that primary producers in the marine environment produce high amounts of the n-3 fatty acid series, and fish have

their fatty acid requirements fully covered by their natural diets, being not necessary to spent energy in the production of those fatty acids, and hence lacking or expressing in a lower extent the necessary enzymes to form those end-products. Therefore, 20:4n-6, 20:5n-3 and 22:6n-3 can be considered essential fatty acids for marine fish (Sargent et al. 2002; Tocher 2003).

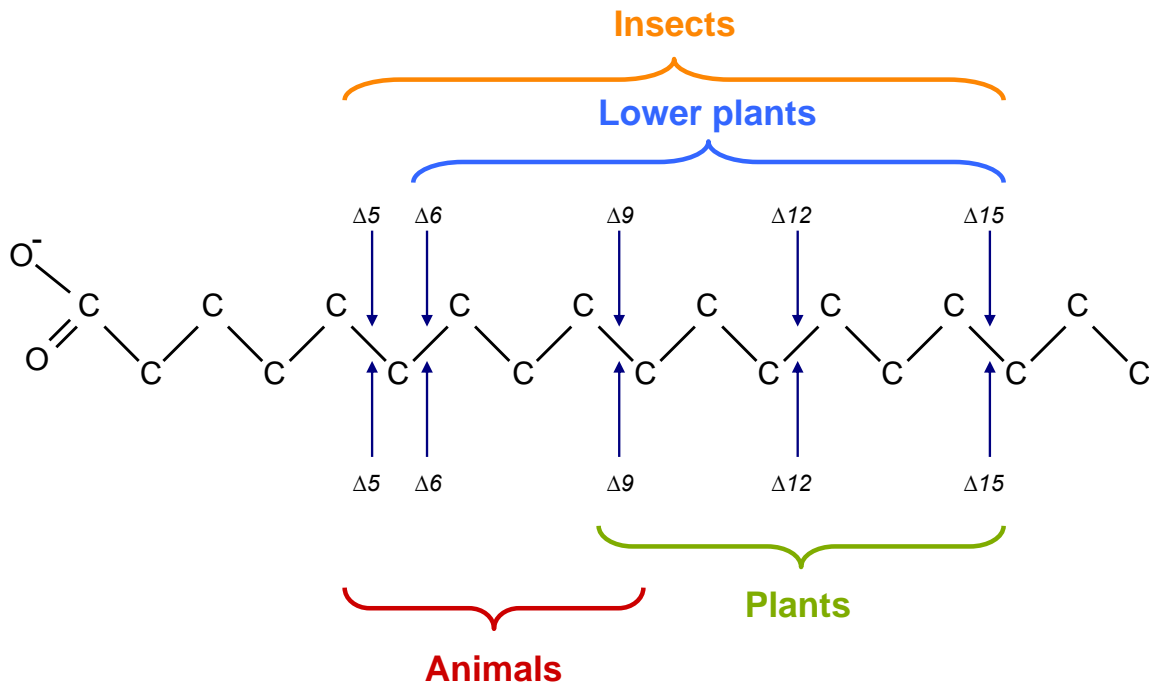


Figure 6. Positions of fatty acyl chain desaturation by enzymes of animals, plants, insects and lower plants (redrawn from Cook and McMaster 2002)

2.3 Fatty acid catabolism

Fatty acids are the main source of energy in fish. The fatty acid catabolism, also termed β -oxidation, is carried out by a number of enzymes different than those used in the biosynthesis, and takes place in both mitochondria and peroxisomes (the last, in the case of fatty acids with 22 carbon atoms length or more). Mitochondrial β -oxidation generates acetyl-CoA for ketogenesis in the liver, besides energy for oxidative phosphorylation (Schulz 2002). Firstly, fatty acids are activated by conversion to fatty acyl-CoA thioesters, which are transported to the mitochondrial matrix via carnitine-dependent translocation when fatty acids are longer than 12 carbon atoms (Figure 7).

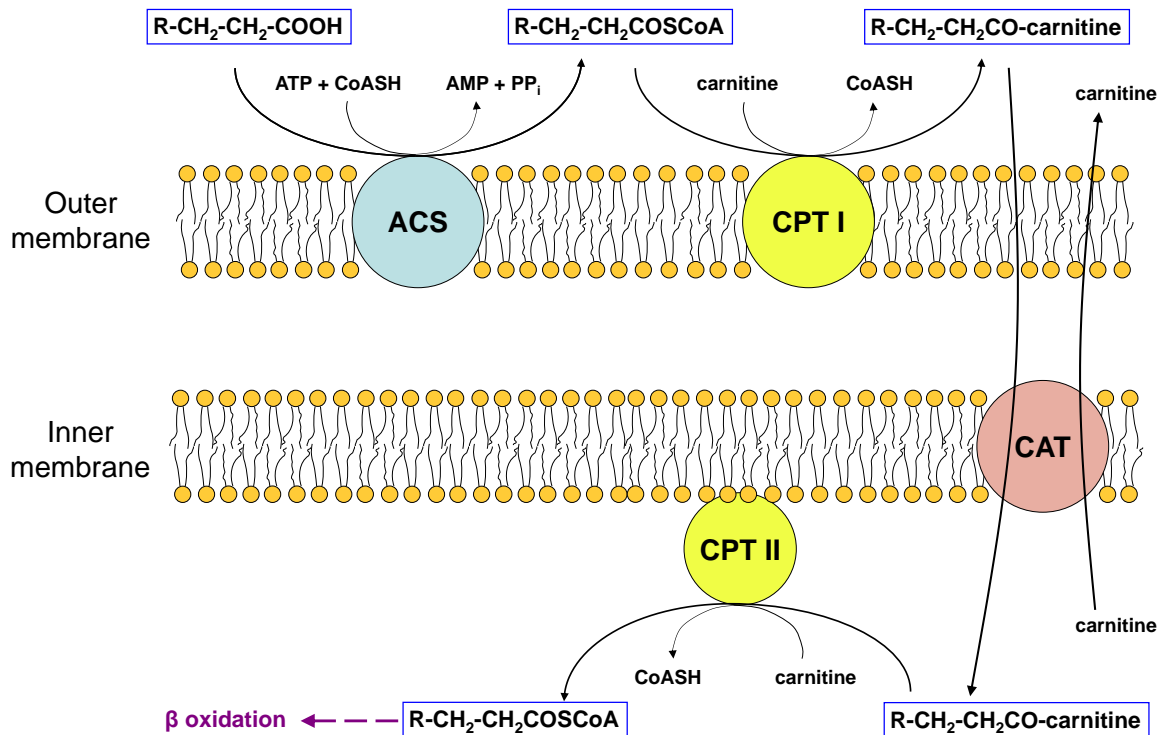


Figure 7. Activation of fatty acids and translocation to the mitochondrial matrix by carnitine-dependent translocation.

ACS: Acyl-CoA synthetase; CPT I and CPT II: carnitine palmitoyl transferase I and II; CAT: carnitine:acylcarnitine translocase (redrawn from [Schulz 2002](#)).

Then the oxidation of the acyl-CoA thioesters is carried out by four different reactions which constitute one cycle of β -oxidation ([Figure 8](#)). Firstly, a dehydrogenation step occurs by acyl-CoA dehydrogenases, producing 2-trans-enoyl-CoA, which will be hydrated by an enoyl-CoA hydratase to L-3-hydroxyacyl-CoA. Next, a dehydrogenation step is catalyzed by an L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase producing 3-ketoacyl-CoA, which will be broken by a thiolase. The end products are acetyl-CoA and acyl-CoA two carbon atoms shorter. In the case of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, at least Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase and 2,4-dienoyl-CoA reductase are needed as auxiliary enzymes of the β -oxidation to act in the double bonds ([Figure 9](#)). Finally, the acetyl-CoA product will be incorporated to the tri-carboxylic acids cycle producing NADH, which will produce energy in form of ATP through oxidative phosphorylation ([Schulz 2002](#); [Tocher 2003](#)). In peroxisomes, fatty acids cannot be totally oxidized and β -oxidation is carried out to shorten the long-chain fatty acids, which will be transported to mitochondria for complete β -oxidation.

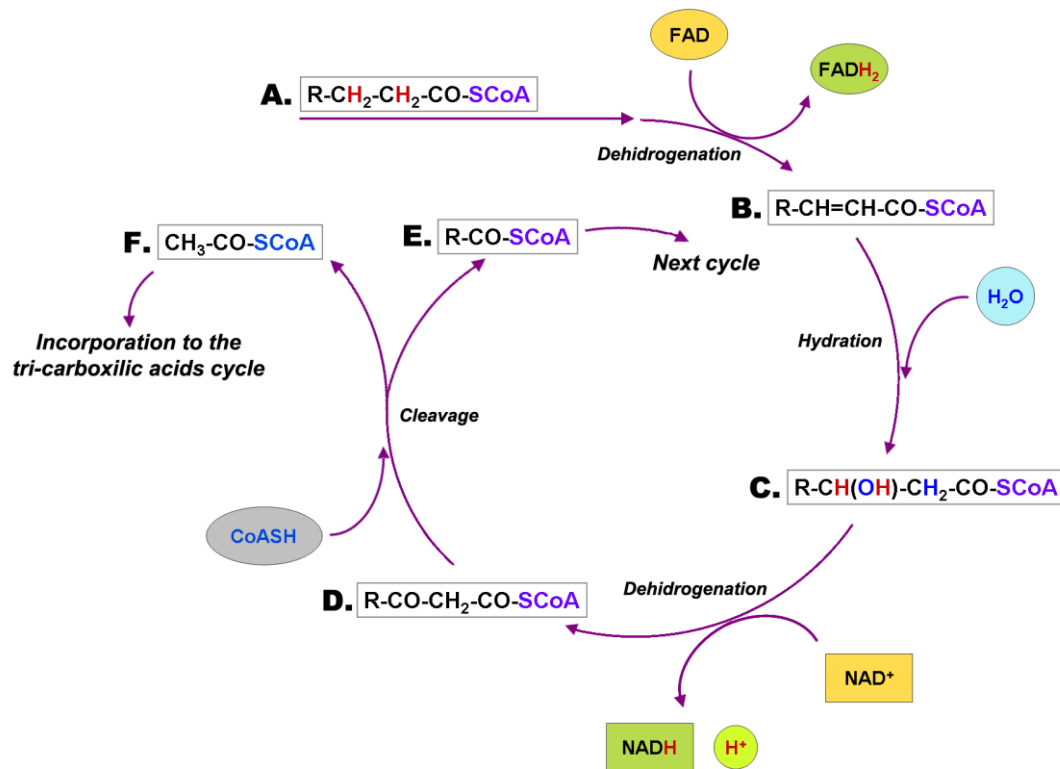


Figure 8. Schematic representation of one cycle of β -oxidation.

A: Activated fatty acid in form of acyl-CoA thioester; B: 2-trans-enoyl-CoA; C: L-3-hydroxyacyl-CoA; D: 3-ketoacyl-CoA; E: new acyl-CoA thioester two carbon atoms shorter; F: acetyl-CoA.

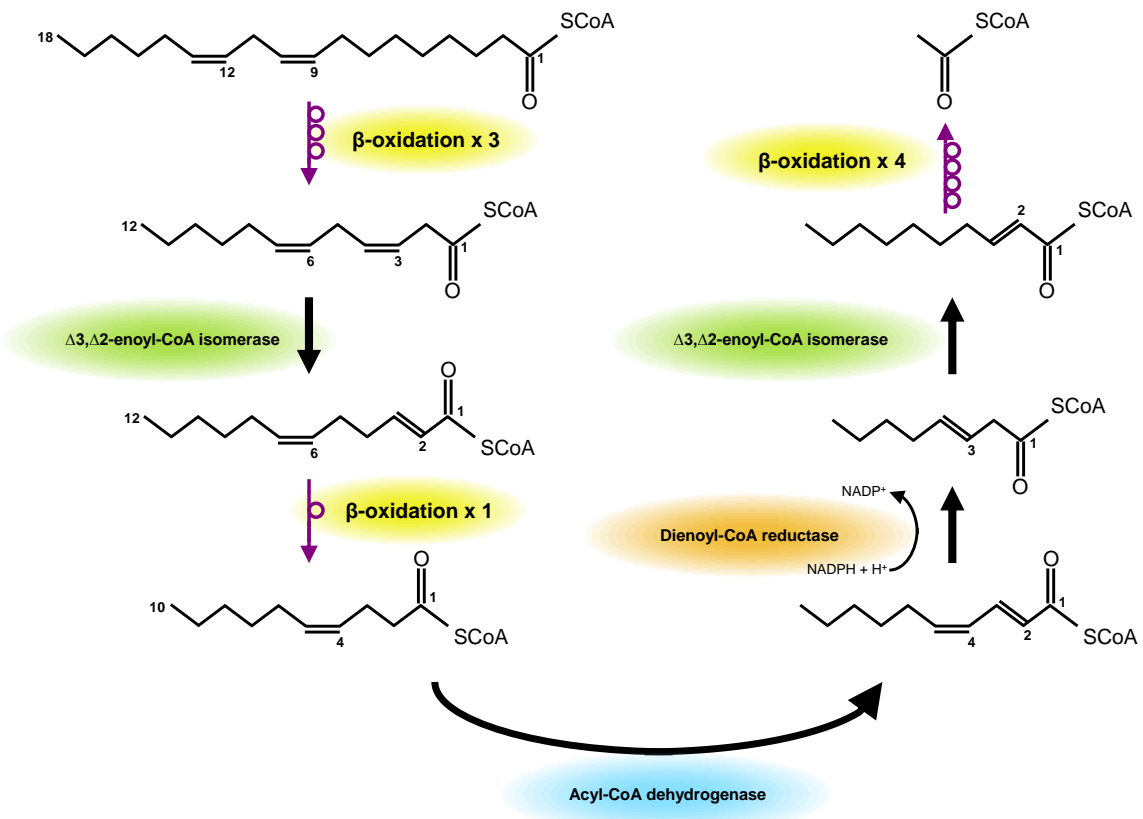


Figure 9. β -oxidation of linoleic acid (redrawn from Schulz 2002).

3. Lipid classes

3.1 Triacylglycerols

Triacylglycerols are the main energy storage in animals, including fish. They are constituted by one molecule of glycerol which present its three alcohol groups esterified with three fatty acids. The three fatty acids can be the same, or just two of them, or every fatty acid can be different. The position where the fatty acids are esterified in, are termed *sn1* and *sn3* for the extremes, and *sn2* for the central position. Saturated and monounsaturated fatty acids tend to be esterified in the positions *sn1* and *sn3* and polyunsaturated fatty acids tend to appear in the position *sn2*, although there are exceptions (Tocher 2003).

3.2 Phosphoglycerides

Commonly named as “phospholipids” (term which designates all lipids containing phosphorus), they are structural components of membranes. Phosphoglycerides are constituted by two fatty acids esterified to a backbone of phosphatidic acid. Likewise triacylglycerols, saturated and monounsaturated fatty acids are preferentially esterified to the *sn1* position, whereas polyunsaturated fatty acids use to be located at the *sn2* position (Sargent et al. 2002). Phosphatidic acid can be esterified to different bases (choline, ethanolamine, serine or inositol), giving raise to phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine and phosphatidylinositol respectively.

3.3 Sphingolipids

Unlike phosphoglycerides, which backbone is phosphatidic acid, sphingolipids are phospholipids constituted by the amino alcohol sphingosine. Usually, the amino group of the sphingosine is esterified to a long chain fatty acid (saturated or monounsaturated), and this molecule is named a ceramide. The alcohol group can be esterified to phosphocholine to form sphingomyeline, or can be esterified to sugars like glucose or galactose to form cerebroside. They have several functions related to signaling pathways, apoptosis and cell cycle (Merril et al 1997), and there are more than 300 known sphingolipids (Bell et al. 1993).

3.4 Wax esters

Wax esters are energy reserves in marine copepods, and they could play a role in buoyancy and energy reserves in marine fish (Nevenzel 1970). They consist in a single fatty alcohol esterified to a single fatty acid. The fatty alcohols can be saturated or monounsaturated, while the fatty acids can be saturated, monounsaturated or polyunsaturated.

3.5 Sterols

Cholesterol is the main sterol in animals including fish. Sterols are structural components of the cell membranes (Yeagle 1985), and can exist as a nonesterified molecule, or can be esterified to a fatty acid. They are important components of membrane lipids, as well as hormones and signalling molecules (Fahy et al. 2005).

4. Functions of fatty acids

4.1 Energy, development and reproduction

Lipids in fish are the main energy metabolic source, by means of ATP generation through β -oxidation of fatty acids. Lipids, and mainly fatty acids are the preferred source of metabolic energy in fish during growth, and they are also for reproduction. The stored fats may be sufficient to fulfill the energetic requirements of both the parents and the eggs (Tocher 2003), the last showing a different fatty acid composition than the body lipids due to selective catabolism, and being 22:6n-3 selectively transferred to the eggs. Fatty acids have also an essential role in the development of brain and retina in all vertebrates (Lauritzen et al. 2001), and it has been shown a relationship between fatty acids and vision, being demonstrated a direct interaction between 22:6n-3 and rhodopsin, enhancing its kinetics (Grossfield et al. 2006).

4.2 Membrane and environment adaptation

The huge variety of lipids that can be found forming part of the cell membranes is the key of the adaptation and survival of the different organisms to variable and/or extreme environments (Hazel and Williams 1990). The physical properties of lipids in general

make them a versatile group of molecules, and alterations in the lipid membrane composition occur in response to changes in water temperature and hydrostatic pressure, and they are also involved in fish buoyancy (Phleger 1998).

Fish that are able to survive in changing temperature environments are expected to respond in a rapidly and reversible way, for example changing the grade of saturation in the fatty acid content, or modifying the ratio of sterols and phospholipids (Cossins and MacDonald 1989; Farkas et al. 2001).

A dense body of research has pointed the importance of 22:6n-3 and highly-unsaturated fatty acids (HUFA) in general for the neural tissue in all vertebrates, including fish (Chrast et al. 2011; Mourente and Tocher 1992; Neuringer et al. 1988). Brain and neural tissues need to be efficiently protected against changes in temperature in order to ensure their biological functions, and the properties of HUFA play an important role compensating temperature alterations. It has been proposed a role of HUFA in increasing the membrane permeability and its predisposition to form vesicles (Stillwell and Wassall 2003), influencing the endocytosis and exocytosis events in synaptic junctions (Schmidt et al. 1999).

4.3 Eicosanoids and immune functions

Long-chain polyunsaturated fatty acids are precursors of a wide range of highly bioactive molecules termed eicosanoids, including prostaglandines, prostacyclins, thromboxanes, leukotrienes and lipoxins (Tocher 2003; Rowley et al. 1995; Russo 2009) (Figure 10). Eicosanoids present an important function modulating the inflammation process and the immune response in mammals but also in fish. 20:4n-6 is the major precursor of eicosanoids, being the most abundant fatty acid in the mammals immune cell membranes. Even in fish immune cells, where 20:5n-3 is the majoritary fatty acid, 20:4n-6 still being the main eicosanoid precursor. Nevertheless, a high dietary intake of n-3 fatty acids and the subsequent increase in the membrane levels of 20:5n-3 and 22:6n-3, lead to a reduction in the amounts of n-6 derived eicosanoids, in favour of n-3 derived eicosanoids. The n-3 derived eicosanoids are biologically less potent than the n-6 derived eicosanoids (e.g. leukotriene B5 derived from 20:5n-3 is 10- to 100- fold less biological effect than leukotriene B4 derived from 20:4n-6) (Calder 2006; Kelley and Rudolph 2000).

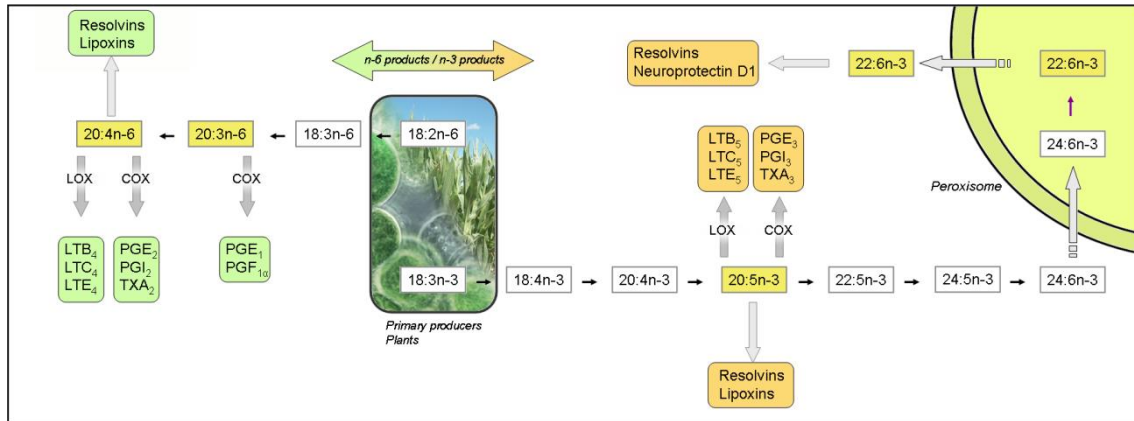


Figure 10. Synthesis of eicosanoids from polyunsaturated fatty acids (modified from Russo 2009).

For details of fatty acid synthesis, see Figure 5.

COX: ciclooxigenases; LOX: lipoxygenases; PG: prostaglandine; TX: thromboxane; LT: Leukotriene.

There exist a variety of eicosanoids. 20:4n-6 is released from the membrane phospholipids by a phospholipase A2 after appropriate stimuli, and metabolized by ciclooxigenases and lipoxygenases to 2-series and 4-series prostaglandines respectively, which are pro-inflammatory molecules (Russo 2009). When high amounts of n-3 fatty acids are taken from diet, both 20:5n-3 and 22:6n-3 act as antagonist of 20:4n-6, generating 3-series prostanoids and 5-series leukotrienes, which have less biological potency than eicosanoids derived from 20:4n-6 (Bell et al. 1992; Alexander 1998; Kelley and Rudolph 2000; Calder 2007). At the same time, n-3 fatty acids are precursors of resolvins and lipoxins which are involved in processes of inflammation reduction (Russo 2009).

Alterations in the fatty acid profile of the immune cell membranes could lead to modifications in the immune response not only by the action of the eicosanoids, but also by membrane alterations affecting to their structure and fluidity and thus showing an effect in the phagocytosis activity, and modifying intracellular signalling pathways and gene expression (Calder 2001, 2007; Hwang 2000; Miles and Calder 1998; Stulnig 2004; Yaqoob 2003).

4.4 Cell messengers

As it has been mentioned above, fatty acids can exert a role not only as structural components or as eicosanoid precursors, but also by activating signaling pathways, interacting with transcription factors, regulating gene expression, or modifying the activity of some proteins and membrane channels (Bruno et al. 2007; Hwang and Rhee 1999; Jump et al. 1996; Nakamura et al. 2001). Polyunsaturated fatty acids surrounding voltage-gated ion channels influence the magnitude and the duration of ionic fluxes across the membrane, and so, polyunsaturated fatty acids can regulate excitability, synaptic transmission, rhythmicity and contractility (Boland and Drzewiecki 2008). Cells can up-regulate or down-regulate gene expression in response to specific signals, as could be the presence of specific fatty acids, modifying their metabolism and/or their cell cycle (Hwang and Rhee 1999). Fatty acids play also a role in calcium metabolism, increasing its absorption by enhancing vitamin D effects and reducing calcium urinary excretion (Kruger and Horrobin 1997). Interactions between polyunsaturated fatty acids and G protein-coupled receptors (GPCRs) (Figure 11) have been demonstrated, as is the case of the interaction between rhodopsin and n-3 fatty acids (Niu et al. 2004), and also the interactions between some eicosanoids and GPCRs, mediating in several physiological processes related to immunity (Serhan 2005; Sugimoto and Narumiya 2007).

It is noteworthy the maintenance of the lipid homeostasis by the regulation at transcriptional level, in response to dietary fatty acids. Both n-3 and n-6 fatty acids are ligands and/or modulators of the nuclear receptors NF κ B, PPAR (peroxysome proliferator activated receptors) and SREBP (sterol regulatory element binding protein), regulating expression of gene related to lipid metabolism, inflammatory signalling, and cellular differentiation among others (Schmitz and Ecker 2008). Several signaling pathways are modulated by fatty acids at multiple levels (cell surface receptors, proximal components of receptor-mediated signaling pathways, intermediate signaling steps and nuclear receptors), which in turn are modulated by the fatty acid composition of the diet (Hwang and Rhee 1999).

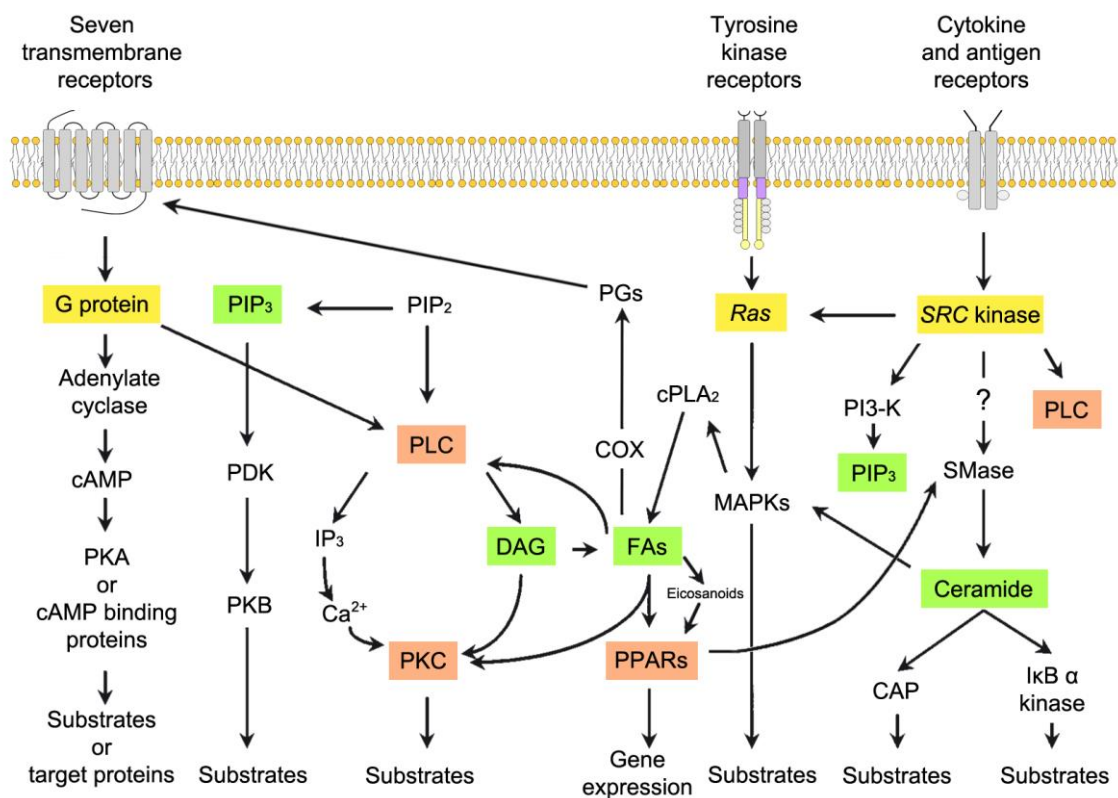


Figure 11. Summary of potential targets of receptor-mediated signalling pathways probably modulated by dietary fatty acids. CAP: ceramide-activated protein kinase; cPLA₂: cytosolic phospholipase A₂; DAG: diacylglycerol; FA: fatty acid; IκB: inhibitory subunit of NFκB; PDK: phosphoinositide-dependent protein kinase; PKA: cAMP-dependent protein kinase; PKB: proto-oncogenic protein kinase; PIP₂: phosphatidylinositol biphosphate; PIP₃: phosphatidylinositol triphosphate; PLC: phospholipase C; PKC: protein kinase C; MAPK: mitogen-activated protein kinase; PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor; SMase: sphingomyelinase (redrawn from Hwang and Rhee 1999).

- Fatty acid acylation required for membrane translocation and activation.
- Lipid mediators.
- Signaling molecules modulated by fatty acids.

5. Vegetable oils in fish feeds: Environmental impacts of sea-cage fish farms

5.1 Effects on water and sediment quality

The rapid growth and development of aquaculture had lead to lay out the consequences to the marine environment. The most important is the existence of an artificial load of

organic matter and nutrients in form of exceed feed, as well as faeces generated by cultivated fish or shellfish, which generates an accumulation of particulate and soluble wastes (Iwama 1991, Sara et al. 2004). This fact has been clearly established in farms located at closed or semi-enclosed locations, as lochs, fjords and bays (Maldonado et al. 2005). Open-sea fish farms have also an impact in the surrounding environment, although there are different factors influencing wastes deposition and changes in the chemical properties of the water column, as it can be the fish production, feed composition and size, current speed and direction, and geomorphological features of bottom sediments (Iwama 1991; Kalantzi and Karakassis 2006; Karakassis et al. 2000; Pérez et al. 2013) (Figure 12). Therefore, environmental impacts may be different and variable in intensity from one farm to another.

The accumulation of the exceed fish feed and faeces can alter the abundance and composition of the related communities at local scale (Sanz-Lázaro et al 2011a; Sliskovic et al. 2011). The increased proportions of particulate organic matter, nitrogen and phosphorus, together with a reduction in the sulphate levels under the sea-cages make the seabed suitable for bacterial growth, which could induces oxygen depletion (Maldonado et al. 2005), and could alter negatively the seagrass distribution (Cancemi et al. 2003; Ruiz et al. 2001), as well as the benthic fauna (Fernandez-Gonzalez et al. 2013; La Rosa et al. 2001; Mirto et al. 2002; Sanz-Lázaro and Marín 2011b).

The fish feeds present high inclusions of vegetable oils in their composition, and the analyses of sediment fatty acids have been used by several authors to elucidate accumulation of vegetable fatty acids and alterations in the bacterial content (Black et al. 2012; Meziane and Tsuchiya 2000; Van Biesen and Parrish 2005). Not only stable isotope analysis but also fatty acid analysis has been used to check the spacial and temporal extent of the fish farms pollution through the deposition of organic matter on the seabed (Black et al. 2012; Budge et al. 2001; Sara et al. 2004; Van Biesen and Parrish 2005).

- A Raft culture of shellfish impeding normal sediment flow
- B Fecal material from shellfish
- C Uncaptured feed from intensive cage culture of finfish
- D Fecal material from finfish
- E Attraction of biota around culture operation

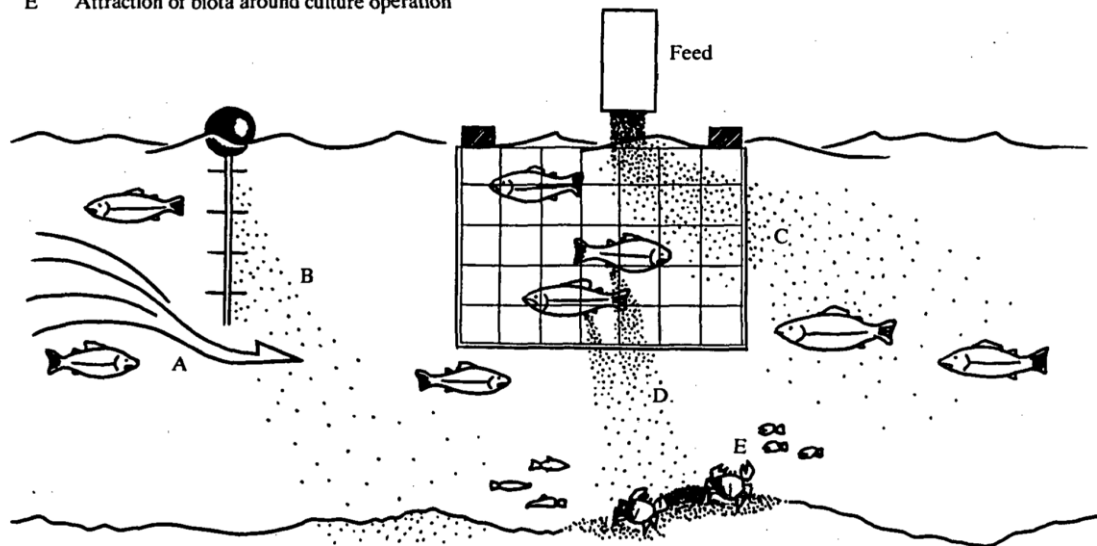


Figure 12. Wastes in aquaculture production (reproduced from Iwama 1991).

5.2 Effects on health and physiology in wild fauna

It has been well established that off-shore fish farms can act as FADs (Fish Aggregation Devices). Wild fish are attracted to artificial structures, as they provide protection and food in form of lost pellets and faeces (Dempster et al. 2009; Sanchez-Jerez et al. 2011). Lost pellets and faeces could be used as a new trophic resource by aggregated wild fish, as well as by the macroinvertebrate organisms associated to the submerged structure and the fauna located under the sea-cages. Aquaculture wastes represent a rich source of vegetable fatty acids, mainly 18:2n-6 and 18:3n-3, and an uncontrolled ingest by de aggregated fauna may have an effect on the health, abundance and composition of the surrounding communities (Dempster et al. 2013). Due to the characteristic lipid composition of the aquafeeds, fatty acids can be used as markers to trace the extent of waste feed and faeces on specific tissues of the aggregated fauna (Arechavala-Lopez et al. 2011).

There exist a wide range of possible health issues due to uncontrolled consumption of aquaculture wastes by wild fish. They can consume large amounts of commercial fish feed, resulting in partial or total substitution of their natural diets during the time that

the fish remain at the farms, and showing an altered physical condition (Dempster et al. 2013). Visceral fat can be increased respect to the non-associated wild fish and the n-3/n-6 fatty acid ratio may be diminished. The relative proportion between n-3 and n-6 fatty acids is more important than absolute amounts of a certain fatty acid regarding to the immunological status (Kiron 2012), and accumulation of 18:2n-6 and depletion of 22:6n-3 use to be common consequences of this kind of change in the dietary habits. Thus, depending on the time that wild fish spent near the fish farms, their immune response could be altered due to changes in eicosanoid production (Gjøen et al. 2004; Rowley et al. 1995). Reproduction and development may be also altered, as the essential fatty acids in gonads and eggs are influenced by the fatty acid composition of the diet (Fernández-Palacios et al. 1995;). Specially important are 22:6n-3 and 22:5n-3, and some prostaglandines, which present a role in the ovogenesis (Sorensen et al. 1988). During the vitellogenesis, there is a strong demand in those fatty acids (Izquierdo et al. 2001), as the amount and quality of the vitello are a key factor in survival of the larvae, being 22:6n-3 essential for a correct neural and visual development (Bell et al. 1995; Bruce et al. 1999). For these reasons, fish feed for broodstock in aquaculture present a higher nutritional quality, but while those reared fish have just access to high quality feeds, aggregated wild breeding fish would have access also to high amounts of the standard feeds with a higher content in n-6 fatty acids, which could affect their natural breeding process.

5.3 Fatty acids as markers to trace trophic relationships

Dalsgaard et al. (2003) defined the concept of trophic marker as a compound easily identifiable, inert and non harmful to the organisms, which is not selectively processed during its ingest, and the most important, its metabolically stable and it can be transferred without alterations to higher trophic levels in a qualitative and quantitative manner.

Based on the previous definition, fatty acids may serve as good trophic tracers as they are incorporated into consumers in a conservative manner, allowing their use to identify predator-prey relationships. Nevertheless, depending on the species, some fatty acids could not be metabolically stable, and their percentage in specific tissues could be dependent on the metabolic status or reproductive cycle of the organisms, being these molecules just used as qualitative and semi quantitative markers in food webs.

Fatty acids have been used in several studies to investigate food web dynamics in marine organisms (Alfaro et al. 2006; Perga et al. 2009; Petursdottir et al. 2008; Shin et al. 2008), and using them as biomarkers of diatoms ($20:5n-3; 16:1/16:0 >1.6; \Sigma 16/\Sigma 18 >2; 22:5n-3/22:6n-3 >1$), dinoflagellates [$22:6n-3; 20:5n-3/22:6n-3 <1$ (Parrish et al. 2000) and $18:5n-3$ (Budge et al. 2001)], bacteria [Σ Odd carbon numbered branched chain fatty acids (Budge et al. 2001) $\Sigma 15+17; 18:1n-7$ (Rajendran et al. 1993)], zooplankton [$20:1+ 22:1$ (Falk-Petersen et al. 2002)], rotifers [$18:1n-7$ (Shin et al. 2008)], algal cells [$16:1n-7; 16:3n-4; 16:4n-3; 16:4n-1; 18:4n-3$ (Kattner et al. 1983; Claustre et al. 1988; Napolitano et al. 1997)], brown macroalgae [$18:1n-9$ (Johns et al. 1979)], red macroalgae [$20:5n-3/20:4n-6 >10$ (Khotimchenko and Vaskovsky. 1990)] and vascular plants [fatty acids containing more than 24 carbons (Sun et al. 2000) and $\Sigma 18:2n-6+18:3n-3$ (Wannigama et al. 1981; Dalsgaard et al. 2003; Hall et al. 2006)]. Fatty acid analysis can also be useful to deduce the diet of an organism (Bachok et al. 2003; Howell et al. 2003), as the stomach content by itself just give information about the food consumed in the previous days, together with the fact that there would be a prevalence of hard parts than soft parts which could be already digested at the sampling time (Iverson et al. 2004). The characteristics of fatty acids are also of great value for quantitative assessment of predator diets (Iverson et al. 2004; Parrish et al. 2015), being useful in both low and high trophic levels (Shin et al. 2008; Kirsch et al. 1998). Nevertheless, a deeper knowledge in the general trends of the fatty acid profiles along several taxonomic groups would be needed in order to ensure optimal conclusions in these kind of research. In any case, the use of fatty acids percentages combined with other techniques strengths their value in trophic interactions research (Parrish et al. 2000).

5.4 Use of fatty acids to track changes in wild fish natural diets

One of the challenges in aquaculture has been to establish an adequate lipid content in fish feed to ensure the maximum growth rates and fat deposition in cultured fish, although the requirements of specific fatty acids can change between different species. Cultured fish are living under certain control, and their diets and therefore, their fatty acid consumption, can be adapted to the necessity of the stock, being modified in case of sickness or changes in water temperature, and special attention is necessary to fulfill the broodstock requirements. It is not the case of aggregated wild fish, which can

remain close to the sea-cages during several months (Uglen et al. 2009), feeding on lost pellets and/or faeces rich in terrestrial fatty acids, due to the easy access to large amounts of high energy food. Thus, aggregated wild fish may consume a diet with a non-natural fatty acid profile, and it could be reflected in the fatty acid percentages of their tissues. Wild fish are not under human control, and the amount and duration of feeding in aquaculture wastes could be long enough to lead to alterations on the reproduction and the immunological status, as well as the ecological implications due to alterations in their feeding behaviour and migration patterns (Sanchez-Jerez et al. 2011). It is important to note the fact that those fish may present a modified n-3/n-6 fatty acid relationship, presenting higher inclusions of n-6 fatty acids. As sea-cages act as ecological traps, a minimum distance of fishing use to be legislated to avoid overfishing of the wild stocks attracted to farms, therefore, fishermen cannot catch fish in the immediate vicinity of fish farms. Nevertheless, the wild fish can be caught when they leave the security of the fish farms, being offered to the consumer as wild fish, but they could present a fatty profile closer to cultured fish, rich in n-6 fatty acids. Therefore the origin of the fish not ensure a natural n-3 rich fatty acid profile for consumers, and fatty acid analysis could play an important role to trace the feeding history of the wild fish (Fernandez-Jover et al. 2007; Arechavala-Lopez et al. 2010).

Despite the fact that fatty acids are relatively ubiquitous in marine environments, fatty acid analysis are a reliable tool to trace alterations in fish diets through variations of certain fatty acids or ratios, which actually, can be attributed to a few types of preys (or fish feeds) (Budge et al. 2006). There are several studies based on fatty acid analysis covering different aspects related to the fish feed consumption, as the work of Fernandez-Jover et al (2009), who found a partial substitution of the natural diet by lost pellets consumption in juvenile fish aggregated around sea-cages. Arechavala-Lopez et al. (2010) showed an interaction between aggregated wild fish and fisheries activity, comparing the fatty acid profile of specimens of *Boops boops* caught by fishermen and specimens captured around aquaculture facilities. In the same way, Skog et al. (2003) demonstrated foraging on commercial fish feed and changes in taste and fatty acid profile of wild saithe *Pollachius virens* from norwegian fjords, due to the presence of fish farms.

In summary, aquaculture industry has increased their importance through the years, and it is expected to provide higher amounts of fish food than traditional fisheries in the future. As a necessity to fulfill the increasing demands of fish and seafood, aquaculture may produce high quality products without compromising the environment, in terms of organic matter pollution and sustainability, but also attempting to reduce at the minimum level the alterations of the physiology, health and behaviour patterns of the wild fauna. The present research is focused in elucidate the possible effects of an unnatural feeding behaviour due to consumption of aquaculture wastes by the aggregated wild fauna.

Objectives

Fish farm sea-cages can act as FADs, attracting a large number of wild fish from different species as well as macroinvertebrate species. The aggregated marine fauna take benefit from the protection provided by the structure of fish farm facilities, and especially from the input of organic matter in form of lost pellets and faeces to the marine environment, which provides them of high amounts of food with high energy levels. Changes in the fatty acid profile of the aggregated specimens may be expected, which could have an effect in their physiology and health status. Therefore, the overall aim of this thesis was to investigate the possible effects of aquaculture waste intake in the fatty acid profile of the marine fauna attracted and aggregated to off-shore fish farms, using specific fatty acids of vegetable origin as tracers of commercial feed consumption.

The specific objectives of the present thesis were:

1 – To check the possible effect of aquaculture waste consumption in different tissues of wild fish species aggregated to fish farms.

- Use of fatty acids as tracers to evaluate the range of aquaculture waste consumption by wild fish, regarding to the distance from a fish farm facility.
- To check the effect in the fatty acid profile of fish from different trophic level.
- To evaluate the transmission prey-predator of fatty acids of vegetable origin.
- To assess possible effects in wild fish reproduction.
- Modification of fatty acid profiles in different ecological compartments focusing in marine macroinvertebrates.
- Modification of fatty acid profiles in sediments under fish farms facilities.

2 – To investigate, in laboratory conditions, the effect of shift from a natural diet to a commercial feed consumption in the fatty acid profile of captured wild fish.

2.1 – To elucidate the magnitude and the rate of change of vegetable fatty acids in different tissues.

2.2 – To assess possible effects in fish health due to such change of diet.

Experimental chapters

Chapter 1

Evaluación del tipo de alimentación a lo largo del tiempo y del estado de salud en juveniles de *Liza aurata* mediante el análisis del perfil de ácidos grasos y del contenido de grasa.

1. Introducción

Durante las últimas décadas, la industria de la acuicultura ha tenido que hacer frente al reto de proveerse de piensos comerciales para peces adecuados desde el punto de vista nutricional, proporcionando un crecimiento óptimo sin descuidar el bienestar y la salud de los peces cultivados, y procurando mantener al mínimo los costes de producción y el impacto medioambiental (Naylor et al. 2000; Pauly et al. 2002, Shepherd et al. 2005). La composición actual de los piensos utilizados incluye proporciones variables de aceites vegetales, sustituyendo parcial o completamente a los aceites de pescado (Dalsgaard et al. 2003; Hardy 2008; Turchini et al. 2010). En términos generales, los aceites de pescado se caracterizan por un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA en sus siglas en inglés), principalmente en ácidos grasos de la serie n-3 como el ácido docosahexaenoico (22:6n-3, DHA) y el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) (Ackmann 1989). Los aceites vegetales utilizados actualmente en la formulación de los piensos derivan de vegetales como soja, colza, girasol o linaza entre otros. A diferencia de los aceites de pescado, estos aceites vegetales son ricos en ácidos grasos poliinsaturados de cadena corta o media, entre los que se incluyen el ácido linoleico (18:2n-6, LA), y el ácido α -linolénico (18:3n-3, LNA), además de ácidos grasos monoinsaturados como el ácido oleico (18:1n-9, OA) y ácidos grasos saturados (Watanabe 2002). La presencia de grandes cantidades de ácidos grasos de origen vegetal en los piensos implica una importante reducción en los niveles de DHA y EPA, los cuales son ácidos grasos esenciales para peces marinos (Glencross 2009; Sargent et al. 2002; Tocher 2003), y también ácido araquidónico (20:4n-6, ARA), un ácido graso normalmente presente en pequeñas cantidades en los tejidos de los peces, pero con importantes funciones metabólicas relacionadas con la reproducción y el sistema inmune (Bell and Sargent 2003; Koven et al. 2001; Rowley et al. 1995).

Es de sobra conocido que las instalaciones de acuicultura en mar abierto pueden actuar como estructuras de agregación de peces (FADs por sus siglas en inglés) (Dempster et al. 2002, 2010; Sanchez-Jerez et al. 2011; Vita et al. 2004), en donde tanto peces como macroinvertebrados pueden beneficiarse de la protección que les proporciona la estructura sumergida así como del pienso excedente que queda disponible a lo largo de la columna de agua (Fernandez-Jover et al. 2008; Gonzalez-Silvera et al. 2015). Se ha demostrado que los peces agregados pueden llegar a consumir hasta un 80 % de pienso

comercial en forma de pellets perdidos (Vita et al. 2004), los cuales difieren de su dieta natural en el alto contenido en grasa así como en su perfil lipídico. El consumo sin control de pienso excedente por parte de los peces salvajes agregados puede provocar una modificación de su contenido en grasa y de su perfil de ácidos grasos, debido a que la capacidad limitada de los peces marinos para metabolizar el exceso de LA y LNA a través de la ruta de síntesis de LC-PUFA (Cook and McMaster 2002; Dalsgaard et al. 2003; Glencross 2009; Tocher 2003). En consecuencia, es de esperar una acumulación de estos ácidos grasos cuando la dieta natural de los peces salvajes agregados a las jaulas se modifica por el consumo de pienso excedente. Otro punto a considerar sería el efecto en el perfil lipídico de un retorno a la dieta natural cuando los peces salvajes migran hacia zonas alejadas de las jaulas. La mayoría de la investigación sobre estos hechos se ha realizado principalmente en músculo, debido a la importancia que tiene su perfil lipídico para el consumo humano (Kris-Etherton et al. 2002; Özogul et al. 2007; Rosenlund et al. 2001; Steffens 1997), mientras que se ha prestado menos atención a otros tejidos. Además, la mayoría de la investigación se centra en especies de peces carnívoros, puesto que la gran parte de los peces cultivados lo son, mientras que las especies herbívoras u omnívoras han recibido menos atención. Por este motivo, la especie modelo de estudio en este trabajo ha sido el mújol (*Liza aurata*, Risso 1810), debido a su dieta omnívora y a su capacidad para adaptarse a zonas de aguas dulces, así como por su alta presencia alrededor de las jaulas de piscifactoría (Arechavala-Lopez et al. 2010; Fernandez-Jover et al. 2009).

El objetivo de este trabajo fue evaluar, en condiciones de laboratorio, el uso de ácidos grasos como marcadores de consumo de pienso a lo largo del tiempo (Dalsgaard et al. 2003; Elsdon 2010), para evaluar en qué medida el cambio de un consumo de dieta natural a un consumo de pienso comercial puede afectar al perfil de ácidos grasos de diferentes tejidos en juveniles de mújol salvajes capturados. También comprobamos si los niveles de esos ácidos grasos marcadores volvían a sus valores normales tras un periodo de lavado, que consistió en un retorno a la ingesta de dieta natural, prestando atención a la velocidad y magnitud de esos cambios. Los tejidos analizados fueron: Músculo, que refleja en un corto espacio de tiempo los cambios en el perfil de ácidos grasos debido a cambios en la dieta; cerebro, que presenta un perfil de ácidos grasos más conservado debido al transporte selectivo de los ácidos a través de la barrera hemato-encefálica y a la biosíntesis de determinados ácidos grasos necesarios para su función; y el hígado, el cual recibe y transforma en primer lugar los ácidos grasos de la

dieta liberados del intestino. Los hepatocitos son responsables del metabolismo de compuestos exógenos y endógenos, además de la síntesis y el almacenamiento de productos como glucógeno, aminoácidos y grasas. Su morfología y la formación de vacuolas en el citoplasma se relacionan con el estado nutricional del pez (Sargent et al. 2002). Por lo tanto, también se evaluaron posibles cambios estructurales en el tejido hepático y modificaciones del patrón de distribución de las gotas lipídicas en los hepatocitos.

2. Material y métodos

2.1 Animales y dietas

Noventa juveniles de mújol (*Liza aurata*) fueron capturados en el Mar Mediterráneo, en la costa sureste de España, y trasladados a un sistema de cubas con agua salada recirculante situado en la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia. El fotoperiodo fue 12 h luz : 12 h oscuridad, y el agua se mantuvo a una temperatura de 19 ± 2 °C, con una salinidad del 33 ‰ y un flujo de agua de 700 l h^{-1} . Los peces fueron alimentados con una dieta natural para omnívoros hasta el comienzo del experimento. LA dieta natural se preparó de acuerdo a las indicaciones de [Goemans and Ichinotsubo \(2008\)](#) para la fabricación de dietas para peces omnívoros, adaptado por el personal del Acuario de la Universidad de Murcia. Tanto la dieta natural como el pienso comercial fueron triturados y mezclados con gelatina y congelados a -20 °C. Los peces, con un peso medio inicial de 7,23 g y una longitud de 7,74 cm, se mantuvieron en ayunas durante las 24 h previas al muestreo.

2.2 Diseño experimental

Los peces se distribuyeron aleatoriamente en seis cubas idénticas (250 l) con 15 peces en cada una de ellas, y fueron alimentados con la dieta natural para omnívoros durante 4 meses para asegurar su completa adaptación a la cautividad. Tras el periodo de aclimatación, los peces de 3 de las cubas fueron alimentados con la misma dieta natural (grupo control) durante todo el experimento (4 meses), mientras que la otra mitad fueron alimentados con una dieta comercial (grupo CD) rica en aceites vegetales durante dos meses, tras los cuales regresaron al consumo de una dieta natural durante otros dos meses (periodo de lavado). Se obtuvieron muestras de músculo, cerebro e hígado a 0, 30, 60, 90 y 120 días. Todos los peces fueron alimentados a un 3 % de su peso corporal al día. En cada punto de muestreo se sacrificaron 3 peces por cuba, y las muestras se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su análisis.

2.3 Recolección de muestras

Los peces se muestrearon en condiciones de esterilidad, y se registró el peso total y la longitud para todos los peces en cada punto de muestreo. Las muestras de músculo se tomaron de la porción dorsal anterior. Una porción de las muestras de hígado fue procesada para histología.

2.4 Crecimiento

Al inicio del experimento se midió la longitud y el peso de todos los especímenes, y se registró el crecimiento por cuba, mediante la obtención del peso inicial (W_i), peso final (W_f), ganancia de peso (%WG), tasa de crecimiento específico (SGR) y el factor de condición (CF), que se calcularon para cada grupo de acuerdo con las indicaciones de [Silva-Carrillo et al. \(2012\)](#): $CF = (\text{peso} \times \text{longitud}^3) \times 100$; $SGR = [(\text{Ln peso final} - \text{Ln peso inicial}) \text{ número de días}^{-1}] \times 100$; y $\%WG = ((W_f - W_i) W_i^{-1}) \times 100$.

2.5 Determinación del perfil de ácidos grasos de los distintos tejidos

Las muestras se analizaron en pools de tres peces por cuba y punto de muestreo. Los ácidos grasos se extrajeron de muestras de 0,5 – 1,5 g, mediante su homogeneización en 20 ml de cloroformo/metanol (2:1 v:v) con un homogeneizador de tejidos Ultra Turrax (IKA ULTRA-TURRAX T 25 digital, IKA-WERKE). Los lípidos totales se obtuvieron de acuerdo al método de [Folch et al. \(1957\)](#) y las impurezas no lipídicas se eliminaron lavando con KCl al 0,88 % (p/v). El peso de los lípidos obtenidos se determinó gravimétricamente tras la evaporación del solvente y el desecado de la muestra durante toda la noche en vacío. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) se obtuvieron mediante transesterificación ácida de los lípidos totales de acuerdo con el método descrito por [Christie \(2003\)](#), y las muestras fueron transmetiladas durante toda la noche en una mezcla de 1 % de ácido sulfúrico en metanol (más 1 ml de tolueno para disolver los lípidos neutros) a 50 °C. Los ésteres metílicos se extrajeron dos veces en 5 ml de iso-hexano/dietil éter (1:1 v/v) tras neutralizar con 2 ml de KHCO_3 al 2 %, se desecaron en atmósfera de nitrógeno y se disolvieron de nuevo en 0.1 ml de iso-hexano. Los ésteres metílicos se purificaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) utilizando iso-hexano : dietil éter : ácido acético (90:10:1 v/v/v). Los FAMES se separaron y cuantificaron mediante cromatografía gas-líquido (Carlo Erba Vega 8160, Milan, Italia) usando una columna capilar (30 m x 0.32 mm de diámetro interno) (CP Wax 52CB, Chrompak, London, UK) e inyección en columna a 50 °C. Como gas transportador se utilizó hidrógeno y la temperatura se programó de 50 °C a 150 °C a una tasa de 40 °C/min, seguido de un incremento hasta 230 °C a una tasa de 2 °C/min. Los ésteres metílicos fueron identificados mediante la comparación con de sus tiempos de retención con estándares conocidos. Los datos fueron recolectados y procesados utilizando Chromcard for Windows (version 1.19). La concentración de los ácidos grasos individuales se expresó como porcentaje del contenido total.

2.6 Clases lipídicas

Se analizaron las clases lipídicas de muestras correspondientes a 0, 60 y 120 días, separándolas mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC). Aproximadamente, 10 µg de extracto lipídico se cargaron en una línea de 2 mm en una placa de silicagel de 10 x 10 cm (VWR, Lutterwirth, England) prelavada, dejando correr el solvente, compuesto por metil acetato : isopropanol : cloroformo : metanol : KCl 0,25% (25:25:25:10:9 en vol.), hasta 2/3 del extremo de la placa. Tras desecar, se dejó correr la placa completamente en iso-hexano : dietil éter: ácido acético (8:2:0,1 en vol.). Las placas se rociaron con acetato de cobre acuoso al 3 % (p/v) conteniendo un 8 % (v/v) de ácido fosfórico, y las diferentes clases se cuantificaron quemando la placa a 160 °C durante 15 min, seguido de una densitometría calibrada utilizando un escáner de TLC con CAMAG “WinCATS” Planar Chromatography Manger software, version 1.2.0. Las clases lipídicas se identificaron mediante su comparación con estándares conocidos. En total se cuantificaron doce clases lipídicas: Lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomielina (SM), fosfatidil colina (PC), fosfatidil serina (PS), fosfatidil inositol (PI), la suma de ácido fosfatídico + fosfatidil glicerol + cariolipina (PA/PG/CL), fosfatidil etanolamina (PE), colesterol (CHOL), ácidos grasos libres (FFA) triglicéridos (TAG).

2.7 Histología del hígado

Se procesaron histológicamente muestras de hígado para estimar la distribución de lípidos en los hepatocitos. Para ello las muestras se fijaron en formaldehído tamponado al 4 % (v/v) durante 12 h, tras lo cual se lavaron y se mantuvieron en etanol al 70 %. Las piezas fijadas se procesaron en un procesador automático de tejidos (MYR, España), y se sumergieron en parafina. Para la observación histológica, se rehidrataron secciones desparafinadas (5 µm), y se tiñeron con hematoxilina-eosina y ácido periódico de Schiff (PAS), para verificar la presencia de glucógeno y evitar alteraciones en la estimación del área correspondiente a grasas. Las preparaciones se observaron en un microscopio Axioskop Zeiss.

2.8 Análisis estereológico

El sistema de análisis de imagen consistió en un microscopio óptico (Zeiss Axioskop, Madrid) conectado a una cámara de vídeo (Sony 151-AP). Se examinó una media de 16 campos visuales a 40x en 6 preparaciones correspondientes a cada grupo experimental,

en muestras a 0, 60 y 120 días (inicio del experimento, tras dos meses de consumo de pienso, y tras dos meses de lavado respectivamente), para detectar la presencia de vesículas en los hepatocitos. Las fotografías fueron convertidas a imágenes de 2 bit en blanco y negro, donde blanco corresponde al área ocupada por las gotas lipídicas, y se midió el porcentaje del área cubierto por estas (MIP 4 advanced v. 5.01.02 software (Microm, Image Processing Software, Consulting Image Digital, Barcelona).

2.9 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar. Los datos de ácidos grasos individuales se analizaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza de doble vía (ANOVA) para determinar diferencias entre grupos. El mismo método estadístico se aplicó a los datos de porcentaje de área de las muestras histológicas. Para el análisis de las diferencias del perfil de ácidos grasos en su conjunto entre los grupos se llevaron a cabo análisis de componentes principales (PCA), porcentajes de similaridad (SIMPER) (Clarke 1993; Warwick et al. 1990), y test de permutaciones (PERMANOVA) (Anderson 2004; Clarke 1993) utilizando 4999 permutaciones. Los análisis de SIMPER se llevaron a cabo usando el índice de similaridad de Bray-Curtis (Bray and Curtis 1957). Los análisis estadísticos se realizaron en SPSS Statistical Software System version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) y Primer (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research; v.6.1.13) y su paquete estadístico complementario PERMANOVA+ (v.1.0.3). Las correlaciones entre ácidos grasos y clases lipídicas se representaron con CIRCOS software (Krzywinski et al. 2009). Al tratarse los datos de porcentajes, estos fueron transformados mediante la función arcoseno $(x + 1)$, y todos los test estadísticos se llevaron a cabo con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$.

3. Resultados

3.1 Crecimiento

Todos los especímenes presentaron un peso inicial similar al inicio del experimento. El CF mostró diferencias significativas entre grupos (Figura 1) a los 60 días del cambio de dieta, y tras 60 días del periodo de lavado. Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento a los 120 días, ganando un mayor peso los peces correspondientes al grupo control que al grupo CD (Tabla 1).

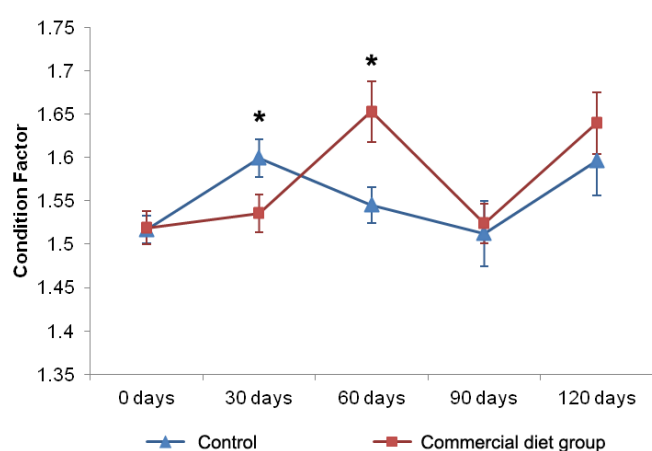


Figura 1. Factor de condición (media \pm E.S.) de los especímenes alimentados con las distintas dietas a cada tiempo de muestreo (90 y 120 días corresponden al período de lavado en el grupo CD). Los asteriscos marcan las diferencias significativas entre grupos ($p \leq 0,05$).

Tabla 1. Crecimiento de los especímenes de mújol alimentados con dieta natural o con pienso comercial tras 120 días de experimentación. Los asteriscos marcan diferencias significativas entre los grupos control y CD ($p \leq 0.05$). Los valores se expresan como media \pm E.S.

Experimental groups	Wi	Wf	SGR	WG%
Control	7.08 \pm 0.03	14.37 \pm 0.28	0.57 \pm 0.02	103.5 \pm 4.49
Commercial feed group	7.30 \pm 0.09	11.10 \pm 0.57*	0.34 \pm 0.04*	52.04 \pm 7.01*

3.2 Composición de las dietas

La dieta natural mostró un mayor porcentaje de ARA, EPA y DHA que el pienso comercial, y un menor porcentaje de OA y LA (Tabla 2). Por lo tanto, se puede afirmar que la dieta natural es más rica en ácidos grasos n-3, mientras que el pienso comercial es más rico en ácidos grasos n-6.

Tabla 2. Ingredientes (g kg^{-1}) de la dieta natural y composición de macronutrientes (% del peso seco) y porcentaje de los principales ácidos grasos de ambas dietas (media \pm E.S.).

Components of natural feed		
Fishmeal (g kg ⁻¹)	241.99	
Shrimp (g kg ⁻¹)	323.13	
Squid (g kg ⁻¹)	81.14	
Freeze-dried algae (g kg ⁻¹)	10.96	
Vitamin supplement (g kg ⁻¹)	14.23	
Red plankton (g kg ⁻¹)	47.40	
Gelatin (g kg ⁻¹)	14.23	
Water (g kg ⁻¹)	266.90	
Composition (dry weight)	Natural feed	Commercial feed
Ash (%)	11.36	6.07
Protein (%)	72.64	58.54
Fat (%)	10.41	16.77
Nitrogen-free extract (%)	5.60	18.62
Fatty acids (%)	Natural diet	Commercial feed
Total saturated	31.63 \pm 0.39	26.06 \pm 0.45
18:1n-9	9.41 \pm 0.09	20.12 \pm 0.04
Total monounsaturated	20.28 \pm 0.22	30.92 \pm 0.07
18:2n-6 (LA)	1.74 \pm 0.05	18.74 \pm 0.10
20:4n-6 (ARA)	2.46 \pm 0.03	0.62 \pm 0.02
Total n-6 PUFA	5.95 \pm 0.07	20.52 \pm 0.09
18:3n-3 (LNA)	0.69 \pm 0.01	2.99 \pm 0.04
20:5n-3 (EPA)	14.89 \pm 0.16	10.49 \pm 0.20
22:6n-3 (DHA)	22.64 \pm 0.39	6.58 \pm 0.15
Total n-3 PUFA	42.14 \pm 0.55	22.49 \pm 0.42
Total PUFA	48.09 \pm 0.62	43.02 \pm 0.51

3.3 Los niveles de ácidos grasos en músculo, cerebro e hígado reflejaron el cambio de dieta

Tras un mes de cambio de dieta, el músculo fue el tejido que presentó un mayor número de diferencias significativas entre los distintos ácidos grasos. Estas diferencias permanecieron incluso tras los dos meses de lavado con dieta natural. Se encontraron diferencias entre ambos grupos en los tres tejidos estudiados, en relación a los porcentajes de LA y LNA, cuyos niveles fueron mayores en el grupo CD que en el grupo control. El porcentaje de DHA en músculo mostró una disminución significativa en el grupo CD en comparación con el grupo control en todos los puntos de muestreo. El DHA en el cerebro solamente mostró una disminución significativa durante el periodo de lavado, mientras que este ácido graso no mostró diferencias en el hígado. El

porcentaje de EPA permaneció sin cambios en músculo y cerebro, mientras que en el hígado se detectó un incremento significativo en el grupo CD tras un mes de consumo de pienso comercial y tras un mes de lavado. ARA mostró valores significativamente menores en el músculo del grupo CD en todos los puntos de muestreo, mientras que en el cerebro solamente hubo una disminución significativa tras dos meses de consumo de pienso comercial y tras dos meses de lavado. No hubo cambios en el porcentaje de ARA en el hígado. El ratio n-3/n-6 fue menor en músculo e hígado de los peces del grupo CD a lo largo de todo el experimento. Mientras que este efecto solo fue significativo en el cerebro tras el segundo mes de consumo de pienso comercial (Figuras 2, 3 y 4).

La figura 5 muestra los resultados del PCA para los perfiles de ácidos grasos de músculo, hígado y cerebro. Las muestras de músculo (Figura 5A) se pueden dividir en dos grupos, uno compuesto por peces del grupo control y otro compuesto por peces del grupo CD, en el que se incluyen los datos de todos los especímenes correspondientes al periodo de lavado (90 y 120 días). El hígado presentó una tendencia similar (Figura 5B), en donde las muestras correspondientes al tiempo 0 aparecieron representadas junto a las muestras del grupo control (30 y 60 días), mientras que algunos peces del grupo CD (aunque no todos) fueron representados separados. Las muestras de cerebro muestran una distribución más homogénea (Figura 5C).

3.4 Distribución del perfil de ácidos grasos

El análisis de PERMANOVA para el periodo de consumo de pienso comercial (30 y 60 días tras el inicio del experimento) y para el periodo de lavado (90 y 120 días tras el inicio del experimento) mostraron diferencias significativas para los tres tejidos estudiados (Tabla 3). El análisis SIMPER mostró que las disimilaridades entre los dos grupos se debieron principalmente a LA, el ácido graso mayoritario del pienso comercial, siendo su contribución entre un 14 % y un 23 % (Tabla 4). La disimilaridad media entre grupos fue mayor durante el periodo de consumo de pienso comercial respecto al periodo de lavado, en músculo e hígado, mientras que el cerebro mostró una mayor disimilaridad media durante dicho periodo.

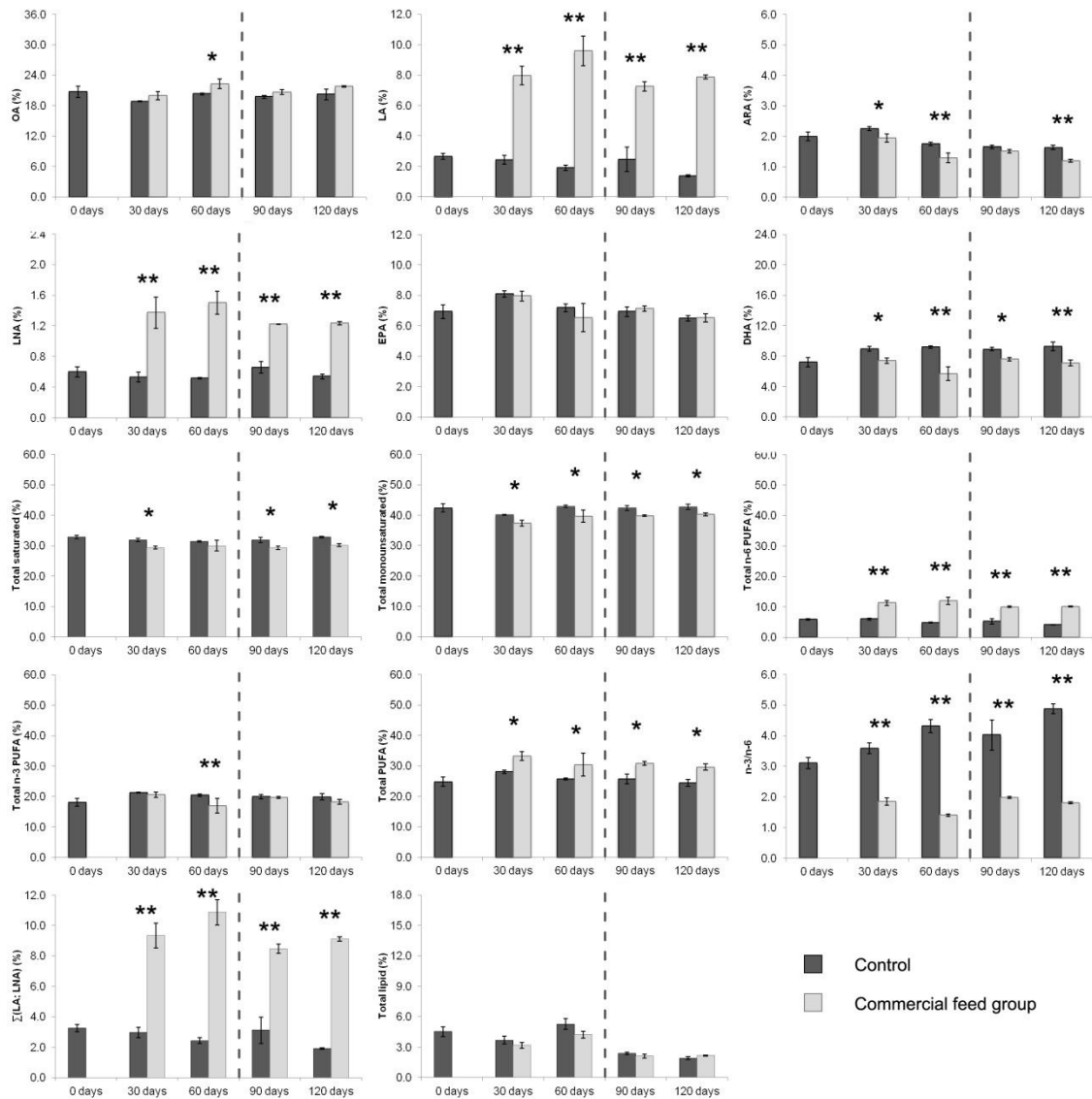


Figura 2. Ácidos grasos y lípidos totales (%) y relación n-3/n-6 (medias \pm E.S.) en muestras de **músculo** de mújol. Las líneas de puntos indican el inicio del periodo de lavado. Uno y dos asteriscos marcan diferencias significativas ($p \leq 0,05$ and $p \leq 0,01$ respectivamente) entre los grupos control y CD a cada tiempo de muestreo.

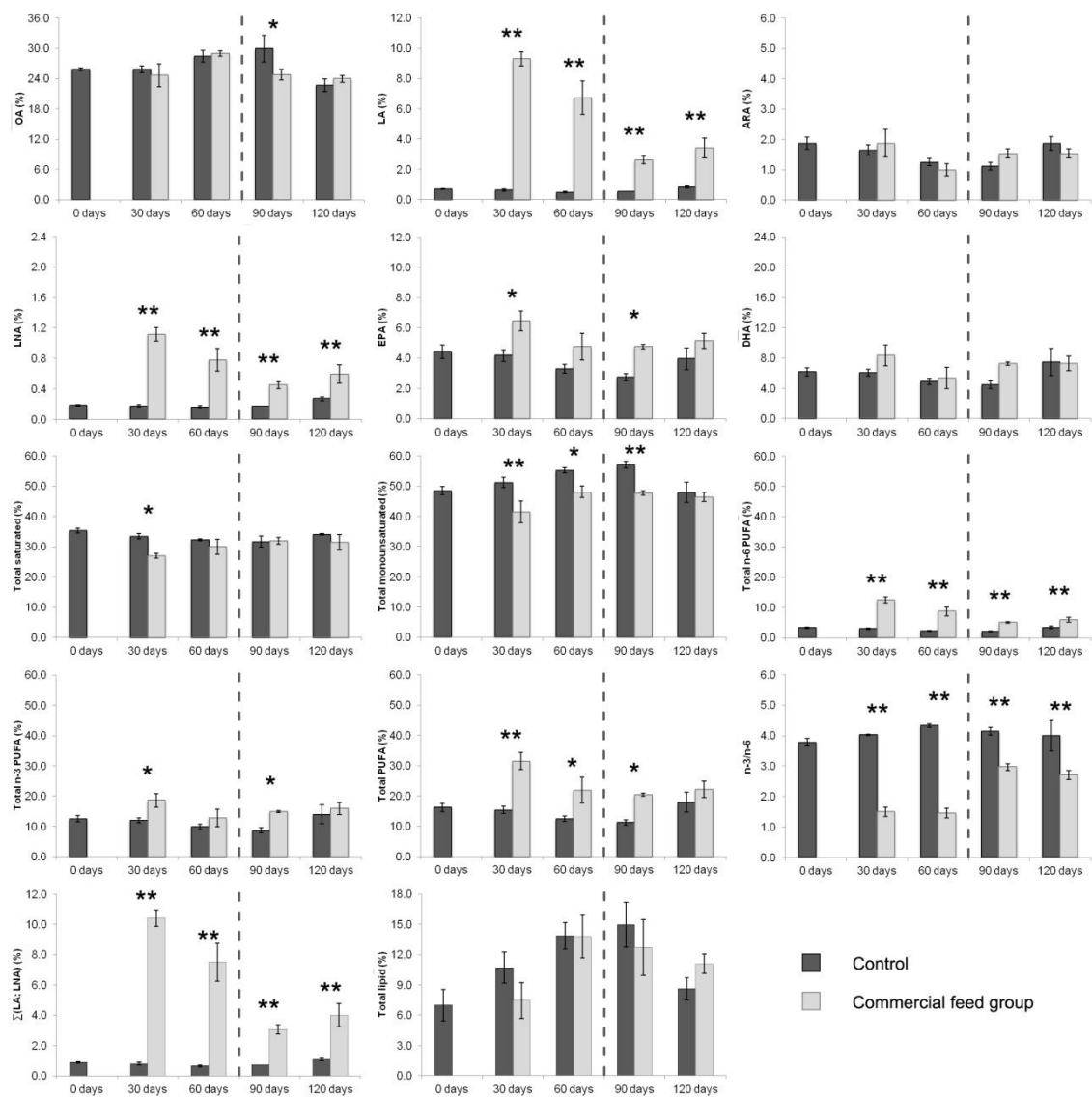


Figura 3. Ácidos grasos y lípidos totales (%) y relación n-3/n-6 (medias \pm E.S.) en muestras de **hígado** de mújol. Las líneas de puntos indican el inicio del periodo de lavado. Uno y dos asteriscos marcan diferencias significativas ($p \leq 0,05$ and $p \leq 0,01$ respectivamente) entre los grupos control y CD a cada tiempo de muestreo.

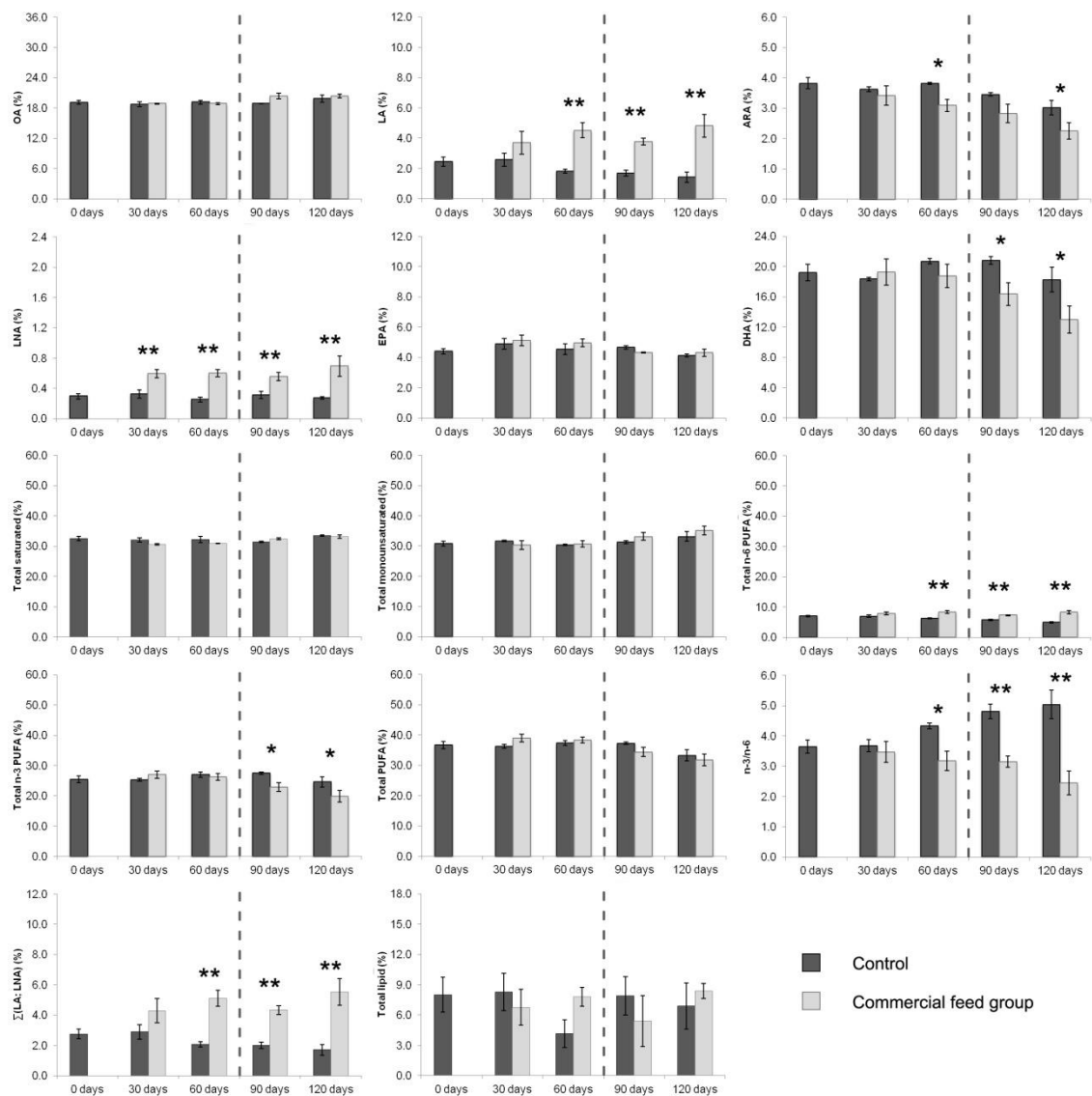


Figura 4. Ácidos grasos y lípidos totales (%) y relación n-3/n-6 (medias \pm E.S.) en muestras de **cerebro** de mújol. Las líneas de puntos indican el inicio del periodo de lavado. Uno y dos asteriscos marcan diferencias significativas ($p \leq 0,05$ and $p \leq 0,01$ respectivamente) entre los grupos control y CD a cada tiempo de muestreo.

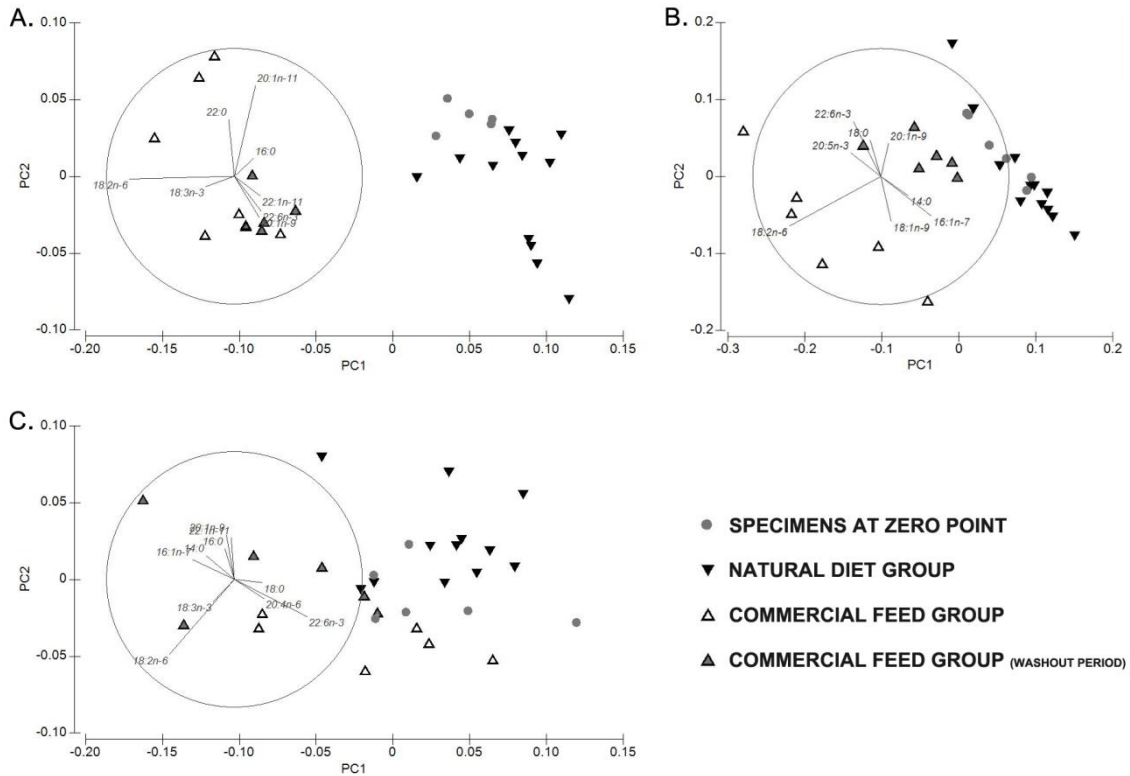


Figura 5. PCA para cada tejido incluyendo todos los ácidos grasos. La varianza total explicada en músculo fue 82,8 % (A), en hígado fue 78,6 % (B), y en cerebro fue 74,9% (C).

3.5 Clases lipídicas

En general, no se encontraron diferencias significativas en las clases lipídicas de los tres tejidos estudiados, con la excepción de PI (a los 60 días) y FFA (a los 120 días) en músculo, y LPC (a los 60 días) en hígado (Tabla 5). Los factores de correlación entre los porcentajes de ácidos grasos y las clases lipídicas, para cada tejido y para todos en conjunto se encuentran disponibles en el material suplementario. Los resultados mostraron un bajo número de correlaciones significativas en músculo, en donde solo 20:1n-11 y 20:1n-9 un buen factor de correlación (≥ 0.700) con FFA. El hígado mostró un alto número de correlaciones estadísticamente significativas entre PI con varios ácidos grasos, especialmente con ARA, el cual también mostró altas correlaciones con SM, PC y total PL. En el cerebro se encontraron altos grados de correlación (PC con 14:0, 15:0 y 18:0; PE con 14:0, 18:0, 18:4n-3 y 20:4n-3; TAG con 14:0, ARA y 16:4). El análisis de todos los datos en su conjunto resultó en un patrón claro, encontrándose altas correlaciones significativas entre PC, PI, PE y total PL, y varios ácidos grasos (Figura 6).

Tabla 3. Resultados del PERMANOVA para el periodo de consumo de pienso comercial (tiempos de muestreo a 30 y 60 días) y para el periodo de lavado (tiempos de muestreo a 90 y 120 días). Los valores de p significativos se muestran en negrita y cursiva.

Flesh						
30 + 60 days	Source	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
	Fatty acid profile	1	172.25	172.25	21.67	<i>0.0016</i>
	Res	10	79.486	79.486		
	Total	11	251.73			
90 + 120 days	Source	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
	Fatty acid profile	1	129.9	129.9	21.746	<i>0.0022</i>
	Res	10	59.735	59.735		
	Total	11	189.63			
Liver						
30 + 60 days	Source	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
	Fatty acid profile	1	442.88	442.88	16.811	<i>0.0024</i>
	Res	10	263.45	26.345		
	Total	11	706.33			
90 + 120 days	Source	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
	Fatty acid profile	1	128.72	128.72	4.225	<i>0.0264</i>
	Res	10	304.67	30.467		
	Total	11	433.4			
Brain						
30 + 60 days	Source	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
	Fatty acid profile	1	29.794	29.794	31.051	0.0754
	Res	10	95.954	95.954		
	Total	11	125.75			
90 + 120 days	Source	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
	Fatty acid profile	1	86.552	86.552	71.558	<i>0.0074</i>
	Res	10	120.95	12.095		
	Total	11	207.51			

Tabla 4. Similaridad de porcentajes (SIMPER), mostrando los tres ácidos grasos que más contribuyeron a las disimilaridades encontradas entre el grupo control y CD, para el periodo de consumo de pienso comercial (tiempos de muestreo a 30 y 60 días) y para el periodo de lavado (tiempos de muestreo a 90 y 120 días). También se muestra el porcentaje acumulado (Cum.%) y la disimilaridad media (Av. Dis.) entre los grupos.

Flesh		Liver		Brain	
30 + 60 days		30 + 60 days		30 + 60 days	
18:2n-6	21.40	18:2n-6	19.77	18:2n-6	14.17
22:6n-3	6.95	16:1n-7	9.14	22:6n-3	7.27
18:3n-3	6.54	18:3n-3	5.23	16:1n-7	6.52
Cum.%	34.88	Cum.%	34.15	Cum.%	27.96
Av. Dis.	8.30	Av. Dis.	13.56	Av. Dis.	4.82
90 + 120 days		90 + 120 days		90 + 120 days	
18:2n-6	23.71	18:2n-6	12.13	18:2n-6	15.44
20:1n-9	6.19	16:1n-7	8.10	22:6n-3	13.03
22:1n-11	6.04	22:6n-3	7.22	16:1n-7	5.25
Cum.%	35.94	Cum.%	27.45	Cum.%	33.71
Av. Dis.	7.19	Av. Dis.	9.36	Av. Dis.	6.61

3.6 Histología del hígado

La observación del parénquima hepático con H-E en microscopio óptico mostró una estructura normal (Figura 7), con los hepatocitos dispuestos en capas de una o dos células de grosor, de tipo saculosinoidal y no lobular, y con una red intercelular de sinusoides y canalículos biliares. Los hepatocitos, de forma poligonal, fueron uniformes en tamaño, con un gran núcleo redondeado y centralizado, y con un prominente nucléolo. En el citoplasma, las vacuolas lipídicas se observaron junto con los gránulos de glucógeno PAS positivos. Se observaron hepatocitos conteniendo numerosas vacuolas lipídicas en las proximidades de los conductos biliares (zona periductular), apenas teñidos con PAS en comparación con los hepatocitos de las zonas no periductulares, los cuales contenían grandes inclusiones de glucógeno. Se observaron algunas células portadoras de melanina (melanomacrófagos) a lo largo del parénquima hepático. El almacenamiento de los lípidos en el parénquima hepático fue homogéneo entre los dos grupos experimentales, y no se encontraron diferencias significativas tanto en la zona periductular como en la no periductular (Figura 8).

Tabla 5. Porcentajes de las clases lipídicas en los tres tejidos estudiados, a 0, 60 y 120 días (medias \pm E.S.). Las diferencias significativas entre dietas para el mismo tiempo de muestreo se representan en negrita y cursiva.

Flesh	0 days	60 days	60 days	120 days	120 days
	Control	Control group	CD group	Control group	CD group
LPC	0.66 \pm 0.30	0.27 \pm 0.27	0.26 \pm 0.26	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
SM	1.07 \pm 0.11	0.43 \pm 0.03	0.49 \pm 0.03	0.79 \pm 0.15	0.99 \pm 0.08
PC	9.98 \pm 0.56	8.79 \pm 0.48	8.99 \pm 0.24	11.45 \pm 0.93	11.15 \pm 1.00
PS	0.83 \pm 0.31	0.00 \pm 0.00	0.51 \pm 0.31	0.97 \pm 0.14	0.93 \pm 0.16
PI	1.24 \pm 0.31	0.00 \pm 0.00	0.79 \pm 0.31	1.96 \pm 0.23	2.03 \pm 0.26
PA/PG(CL	1.78 \pm 0.21	1.23 \pm 0.10	1.54 \pm 0.10	0.90 \pm 0.12	1.22 \pm 0.17
PE	7.96 \pm 0.47	6.78 \pm 0.36	6.69 \pm 0.30	6.96 \pm 0.61	6.71 \pm 0.72
Total PL	23.53 \pm 1.69	17.5 \pm 0.54	19.26 \pm 0.52	23.04 \pm 1.86	23.03 \pm 2.32
CHOL	10.87 \pm 0.58	11.66 \pm 0.89	9.96 \pm 0.35	12.65 \pm 0.54	12.86 \pm 0.92
FFA	13.14 \pm 0.51	13.81 \pm 0.56	12.73 \pm 0.83	1.71 \pm 1.71	5.81 \pm 0.77
TAG	52.46 \pm 2.33	57.04 \pm 1.87	58.05 \pm 1.66	62.60 \pm 2.84	58.30 \pm 3.20
Liver					
	0 days	60 days	60 days	120 days	120 days
	Control	Control group	CD group	Control group	CD group
LPC	0.50 \pm 0.08	0.39 \pm 0.31	0.00 \pm 0.00	0.08 \pm 0.08	0.00 \pm 0.00
SM	2.79 \pm 0.31	1.57 \pm 0.11	1.28 \pm 0.17	2.39 \pm 0.20	1.59 \pm 0.02
PC	10.56 \pm 0.89	6.84 \pm 0.14	6.57 \pm 1.20	8.68 \pm 0.28	8.23 \pm 0.95
PS	0.25 \pm 0.12	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.11 \pm 0.11	0.00 \pm 0.00
PI	0.41 \pm 0.26	0.00 \pm 0.00	0.19 \pm 0.19	0.72 \pm 0.58	0.66 \pm 0.33
PA/PG(CL	1.19 \pm 0.44	0.58 \pm 0.16	0.31 \pm 0.31	0.87 \pm 0.44	1.12 \pm 0.23
PE	7.77 \pm 0.81	4.27 \pm 0.38	4.83 \pm 1.07	5.2 \pm 0.41	5.60 \pm 0.63
Total PL	23.46 \pm 2.40	13.64 \pm 0.53	13.17 \pm 2.53	18.07 \pm 0.25	17.20 \pm 1.58
CHOL	42.77 \pm 1.99	17.14 \pm 0.66	17.15 \pm 0.41	13.96 \pm 1.89	18.89 \pm 1.48
FFA	8.07 \pm 1.13	36.33 \pm 0.85	40.72 \pm 1.49	41.97 \pm 3.10	36.82 \pm 0.86
TAG	25.69 \pm 2.50	32.89 \pm 0.69	28.97 \pm 0.93	26.00 \pm 1.90	27.09 \pm 3.70
Brain					
	0 days	60 days	60 days	120 days	120 days
	Control	Control group	CD group	Control group	CD group
LPC	0.30 \pm 0.30	1.23 \pm 0.63	1.56 \pm 0.97	1.97 \pm 0.45	0.94 \pm 0.48
SM	1.51 \pm 0.33	0.92 \pm 0.92	1.26 \pm 0.32	0.95 \pm 0.18	1.38 \pm 0.74
PC	17.30 \pm 1.15	18.49 \pm 1.42	14.63 \pm 0.49	13.77 \pm 1.20	12.96 \pm 1.07
PS	2.82 \pm 1.73	2.68 \pm 2.68	1.66 \pm 1.66	1.83 \pm 1.83	3.50 \pm 2.96
PI	3.74 \pm 0.94	5.87 \pm 1.81	4.64 \pm 1.64	4.22 \pm 1.85	3.07 \pm 1.61
PA/PG(CL	2.48 \pm 0.84	1.44 \pm 0.77	1.56 \pm 0.18	1.19 \pm 0.73	1.06 \pm 0.58
PE	22.13 \pm 0.82	20.48 \pm 1.15	17.14 \pm 0.90	17.32 \pm 1.29	17.38 \pm 1.10
Total PL	50.28 \pm 2.82	51.10 \pm 3.82	42.45 \pm 2.12	41.26 \pm 4.18	40.29 \pm 4.42
CHOL	19.70 \pm 1.55	16.51 \pm 1.58	17.26 \pm 0.76	19.41 \pm 1.16	17.86 \pm 1.54
FFA	8.66 \pm 1.79	11.22 \pm 0.68	11.11 \pm 0.26	10.12 \pm 0.86	10.16 \pm 1.10
TAG	21.36 \pm 3.46	21.17 \pm 1.75	29.18 \pm 2.07	29.21 \pm 4.31	31.69 \pm 4.38

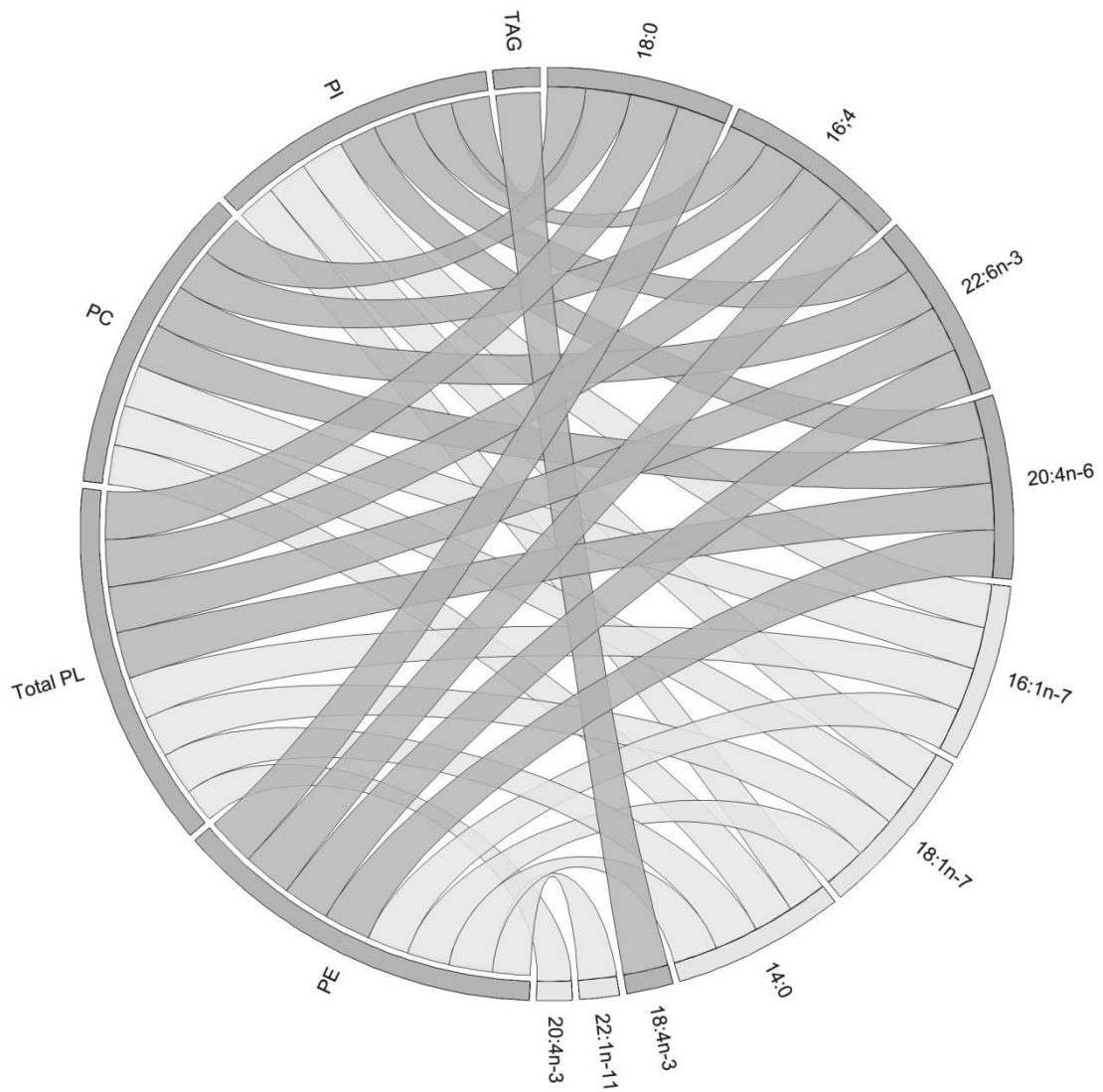


Figura 6. Diagrama circular que muestra las correlaciones entre ácidos grasos y las clases lipídicas de los tres tejidos estudiados. Solo se muestran los resultados significativos ($p \leq 0,05$) con un alto índice de correlación ($\geq 0,700$). Los lazos gris oscuro y gris claro indican correlaciones positivas y negativas respectivamente.

4. Discusión

El músculo suele ser el tejido de referencia a la hora de realizar análisis de ácidos grasos en peces, debido a la alta disponibilidad de tejido, y por su importancia para el consumo humano (Fountoulaki et al. 2009; Izquierdo et al. 2005). Es por ello que se puede encontrar en la bibliografía información sobre el perfil de ácidos grasos del músculo de una gran variedad de especies (Murillo et al. 2014; Özogul et al. 2007; Prato and Biandolino 2012). Sin embargo, la composición de ácidos grasos no debe ser la misma en todos los tejidos, siendo por tanto de gran interés la comparación de distintos órganos con diferentes grados de exposición a los ácidos grasos de la dieta, los cuales deben presentar disimilaridades en su almacenamiento y uso. Por esta razón se estudió la respuesta a cambios de dietas con diferentes contenidos en ácidos grasos, en músculo, hígado y cerebro, simulando la llegada de mújoles a los alrededores de las piscifactorías.

Los resultados confirmaron la utilidad de LNA, y especialmente de LA, como marcadores para rastrear el consumo de piensos artificiales por parte de los peces salvajes agregados a las jaulas, debido a su rápida acumulación en músculo en tan solo un mes de consumo de pienso comercial, y a su persistencia en los tres tejidos estudiados tras dos meses de lavado.

Tanto LA como LNA mostraron altos porcentajes en músculo e hígado tras un mes de consumo de pienso comercial, en comparación con los porcentajes medidos en peces que consumieron la dieta natural. Y lo que es aún más importante, esos porcentajes no volvieron a sus valores originales al finalizar el experimento, tras dos meses de lavado con la misma dieta natural. Los porcentajes de los ácidos grasos esenciales ARA y DHA en las muestras de músculo fueron menores que en las muestras del grupo control, incluso al final de periodo de lavado. Sin embargo, este efecto se mostró atenuado en el cerebro, en donde los niveles de ARA fueron significativamente diferentes solo a los 60 días de consumo de pienso comercial y a los 60 días de lavado con la dieta natural.

Estos resultados confirman la idea de un cambio rápido en los porcentajes de ácidos grasos del músculo, mientras que el número de ácidos grasos que presentaron diferencias significativas entre los grupos fue menor en cerebro, en donde los cambios fueron de menor magnitud que en músculo, lo que sugiere que la incorporación de los

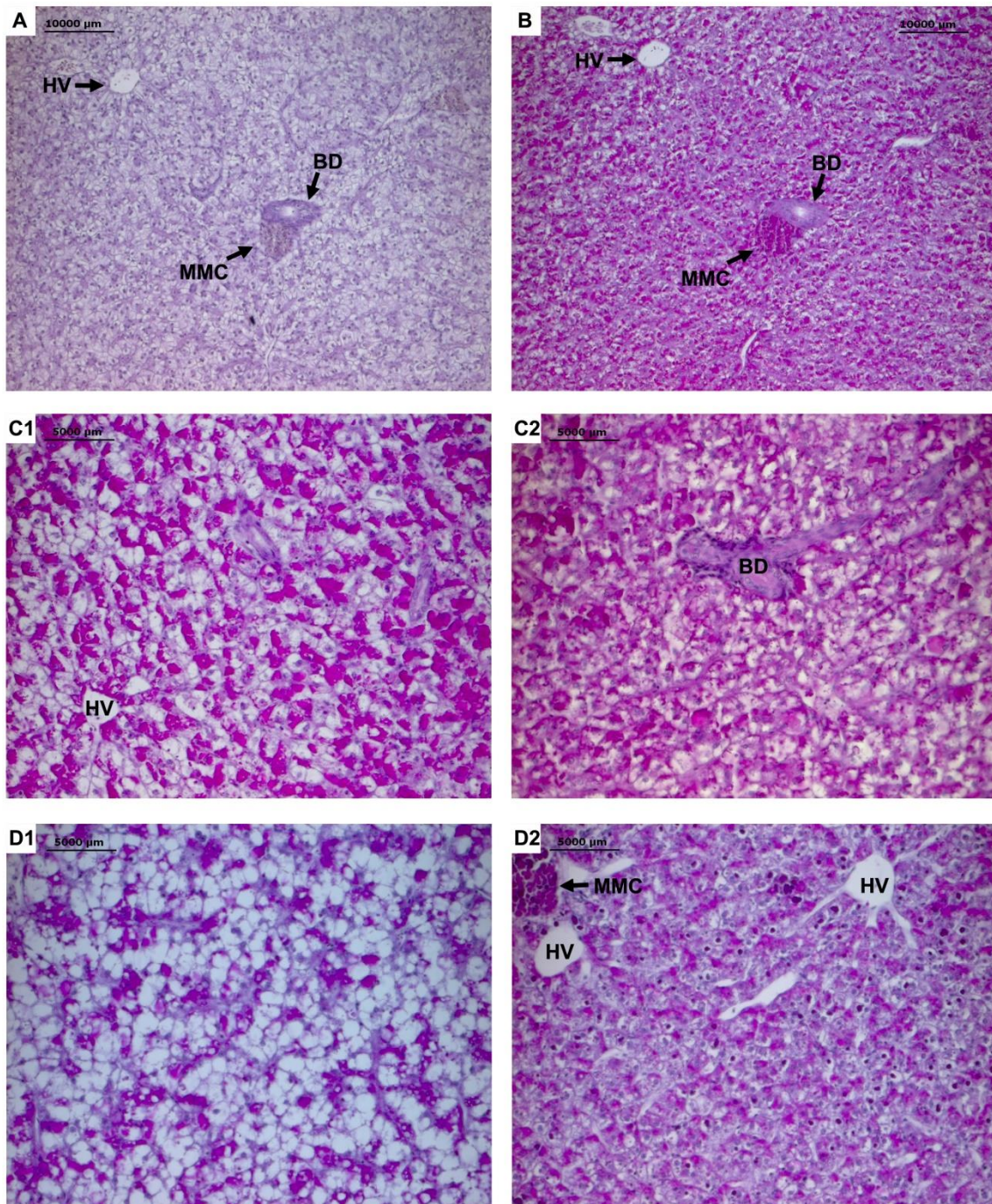


Figura 7. Fotografías al microscopio óptico de secciones de hígado de *L. aurata* teñidas con HE (A) y con PAS (B).

Tinción PAS en hígados del grupo control a 60 días (C1) y a 120 días (C2).

Tinción PAS en hígados del grupo CD a 60 días (D1) y a 120 días (D2) (periodo de lavado).

HV: vénula hepática; BD: conducto biliar; MMC: centro de melanomacrófagos.

ácidos grasos al cerebro es un proceso lento, probablemente debido a su transporte selectivo a través de la barrera hematoencefálica (Moore et al. 1990; Spector 1988). A diferencia del músculo y del cerebro, los porcentajes de EPA y DHA en hígado no mostraron cambios entre grupos.

Nuestros resultados son similares a los encontrados por Almáida-Pagán et al. (2007) en otra especie marina e omnívora, el sargo picudo (*Diplodus puntazo*), mostrando mayores proporciones de LA y LNA en peces que se alimentaron con una dieta rica en aceites vegetales en comparación con una dieta rica en aceites de pescado. Estos autores también observaron una disminución en los porcentajes de EPA y DHA en el hígado, cambios que no han sido observados en el hígado de nuestros especímenes de mújoles, los cuales sí que presentaron niveles significativamente mayores de EPA en hígado en comparación con el grupo control a los 60 y 120 días, y presentando DHA mayores niveles que los controles en músculo y cerebro. Bell et al. (2003) mostraron que los porcentajes de EPA y DHA en músculo se redujeron en especímenes de salmón atlántico (*Salmo salar*) alimentados con una dieta rica en aceites vegetales en comparación con los que se alimentaron de una dieta rica en aceites de pescado. De manera parecida a nuestros resultados, ellos encontraron que los niveles de esos dos ácidos grasos se restauraron parcialmente cuando los peces cambiaron a una dieta finalizadora con un 100 % de aceites de pescado durante 20 semanas, pero siendo siempre sus porcentajes significativamente menores que en peces alimentados exclusivamente con la misma dieta preparada con un 100 % de aceites de pescado durante 70 semanas. Otro estudio similar en lubina (*Dicentrarchus labrax*) mostró las mismas tendencias: Menores porcentajes de EPA y DHA y mayores porcentajes de OA, LA y LNA en peces alimentados con una dieta rica en aceites vegetales (Mourente et al. 2005). En ese mismo estudio, los peces que se alimentaron con una dieta finalizadora rica en aceites de pescado durante 14 semanas recuperaron sus porcentajes originales de DHA y de ácidos grasos n-3 totales, aunque EPA permaneció a niveles menores. En nuestro estudio, un periodo de lavado de 8 semanas con dieta natural no fue suficiente para que los niveles de DHA regresaran a los valores control en ninguno de los tejidos estudiados. Sin embargo, los estudios mencionados se centran en la recuperación de los niveles de ácidos grasos n-3, mientras que se le presta menos atención a los niveles de LA, el cual en este trabajo, se acumuló en músculo e hígado, y en menor medida en cerebro, y sus valores permanecieron casi inalterados tras los 60 días de lavado. Regost

et al. (2003) obtuvo resultados similares en rodaballo (*Psetta maxima*), usando una dieta finalizadora rica en aceites de pescado durante 60 días. Nuestros resultados concuerdan con la aparente incapacidad del mújol, y de los peces marinos en general para elongar y desaturar LA (Mourente and Tocher 1993), como ya ha sido mencionado anteriormente.

El uso del músculo debe considerarse como la primera opción para rastrear la incorporación de aceites vegetales en peces salvajes agregados. El músculo de mújol responde rápidamente, reflejando en tan solo un mes (y probablemente en menos tiempo) el perfil lipídico del pienso comercial. En este sentido, el cerebro ha mostrado ser un tejido más conservativo (Moore 1990; Soengas and Aldegunde 2002), aunque también reflejó cambios relacionados con la composición de ácidos grasos de la dieta. Estos cambios fueron de poca comunidad y ocurrieron despacio en el tiempo, siendo necesarios dos meses para mostrarse. Igualmente, cuando los peces del grupo de pienso comercial volvieron a la ingesta de dieta natural, el cerebro volvió a mostrarse más resiliente a los cambios que el músculo o el hígado. Esta propiedad hace que el cerebro sea una herramienta útil para rastrear, mediante el análisis de ácidos grasos, alteraciones en la dieta de peces salvajes, especialmente cuando se combina con el análisis de músculo. Mientras que el músculo muestra cambios que ocurren en un corto espacio de tiempo, el cerebro es capaz de mostrar la acumulación de ácidos grasos de origen vegetal en una escala de tiempo mayor. Incluso si los peces vuelven a ingerir una dieta natural durante suficiente tiempo como para permitir al músculo recuperar sus valores normales de ácidos grasos, los cambios tardaría aún más en desaparecer del cerebro y seguirían siendo detectables durante un periodo de tiempo mayor, por lo que recomendamos encarecidamente el uso de ambos tejidos para trazar la historia dietética de los peces salvajes agregados. Sin embargo no es el caso del tejido hepático, cuyo perfil de ácidos grasos también refleja rápidamente el cambio en la dieta, pero mostrando una mayor variabilidad que el músculo o el cerebro. Además de la función de almacén de lípidos, el hígado presenta una alta actividad metabólica, especialmente frente a los lípidos de la dieta, los cuales son metabolizados e incorporados a lipoproteínas antes de ser transportados al resto del organismo (Sheridan 1988; Tocher 2003). Toda esta actividad metabólica implica la movilización y transformación de los lípidos almacenados y de los procedentes de la dieta, en función de diferentes factores como la maduración sexual, muda de piel (Almansa et al. 2001; Greene and Selivonchick 1987), infecciones (Calder 2007; Trichet 2010) o el estado nutricional. Por

lo tanto, el perfil de ácidos grasos del hígado debe ser más variable en el tiempo, haciendo del hígado un tejido menos apropiado para el rastreo del consumo de ácidos grasos de origen vegetal. Por ejemplo, los niveles de LA y de LNA en el hígado en peces que consumieron la dieta comercial fueron más parecidos a los valores control que los niveles de esos ácidos grasos en músculo tras 60 días de lavado, aunque este tiempo no fue suficiente como para volver a los valores originales. A pesar de los altos niveles de LA y LNA en el hígado, los valores de DHA y ARA no mostraron diferencias entre los dos grupos, lo que podría estar relacionado con la ausencia de cambios en el patrón de distribución de las gotas lipídicas en los hepatocitos, ya que algunos ácidos grasos como el ARA pueden tener un papel importante en la formación de vesículas celulares (Schmidt et al. 1999).

Cabe destacar el hecho de que a lo largo de todo el experimento, el porcentaje de ARA en el cerebro de ambos grupos permaneció a niveles más altos que los porcentajes de este ácido graso tanto en la dieta natural como en el pienso comercial. Estos datos sugieren que el ARA juega un importante papel fisiológico en el cerebro de *L. aurata*, aunque desconocemos de qué modo se regulan sus porcentajes en este órgano. Aunque es sabido que los peces marinos tienen una capacidad limitada para convertir LA y NA en LC-PUFA (Glencross 2009; Tocher 2003), podemos especular en la posibilidad de un proceso de elongación/desaturación específico de tejido (Bell and Tocher 2009), siendo el cerebro capaz de producir ARA a partir de LA cuando el aporte dietético no es suficiente para cubrir los requerimientos de este órgano (Moore et al. 1990). Al ser un pez eurihalino, *L. aurata* puede ser encontrado no solo en el medio marino sino también en zonas de aguas dulces y en consecuencia, la biosíntesis de HUFAs podría ser posible en esta especie (Koussoroplis et al. 2011). Sin embargo estas conjeturas hay que tratarlas con precaución, ya que se ha sugerido que en peces marinos, la $\Delta 6$ desaturasa (una de las enzimas encargadas de la desaturación de determinados ácidos grasos) está más implicada en el cerebro en el mantenimiento de niveles óptimos de DHA que de ARA (Bell and Tocher 2009). La retención específica de ARA en el cerebro es otra posibilidad. Koussoroplis et al. (2011) encontró retención de ARA en el músculo de ejemplares de *L. aurata* y otros mugílidos. Nuestros resultados en condiciones de laboratorio no mostraron evidencias de retención de ARA en músculo o hígado, aunque no se puede descartar que esta sea la causa de los niveles de ARA encontrados en cerebro.

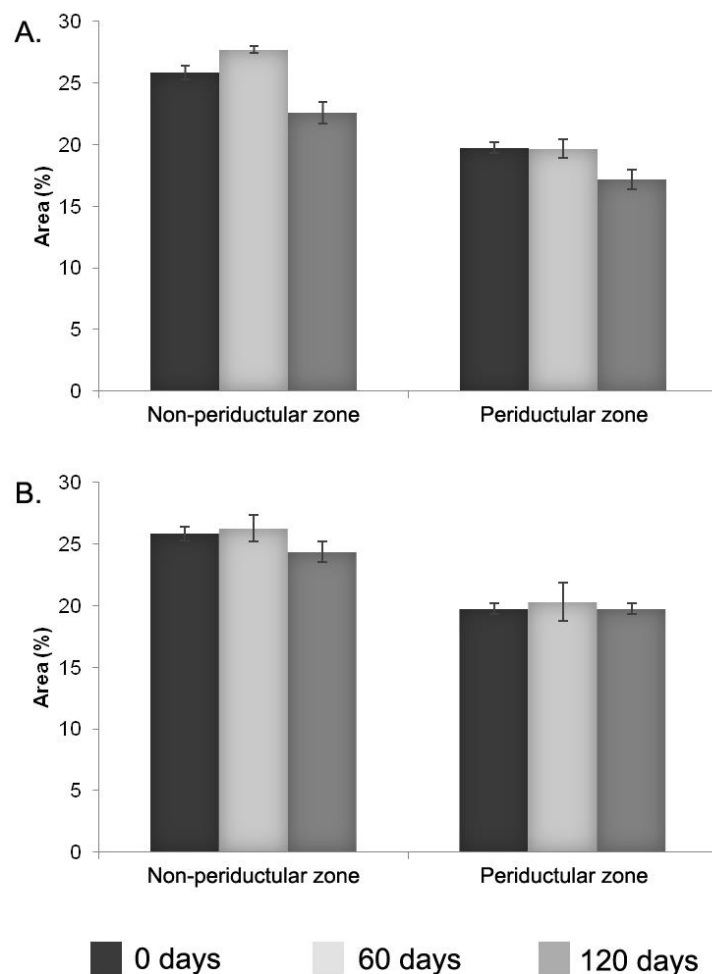


Figura 8. Contenido en vacuolas lipídicas deñ hígado (%) del grupo control (A) y del grupo CD (B). Los valores se expresan como media \pm S.E.

Los triglicéridos se almacenan en el hígado y en los depósitos de grasa mesentérica, y son la principal fuente de energía en peces (Greene and Selivonchick 1987; Sargent et al. 2002; Sheridan 1988), mientras que los fosfolípidos son componentes estructurales de las membranas celulares (Stoknes et al. 2004; Tocher et al. 2008). La ausencia de diferencias significativas en las clases lipídicas entre los grupos experimentales indica que no hay un efecto relativo a la dieta en los niveles de los componentes estructurales en los que se esterifican los ácidos grasos, al menos durante un cambio de dieta de dos meses, de una dieta natural a una comercial. Algunos ácidos grasos se esterifican

preferencialmente en determinadas clases lipídicas. La ausencia de cambios importantes en las clases lipídicas se ve reflejada en el bajo número de altas correlaciones entre los ácidos grasos y las clases lipídicas. Sin embargo, cada tejido presenta una composición característica de clases lipídicas, y el uso de todos los datos en su conjunto nos permitió obtener buenas correlaciones significativas entre fosfolípidos y varios ácidos grasos. Se puede concluir que 18:0, 16:4, ARA y DHA se acumulan en los fosfolípidos en juveniles de mújol, lo cual coincide con los datos obtenidos en otras especies de peces (Bell et al. 1996; Greene and Selivonchick 1987; Tocher et al. 2008).

En general, el examen histológico del hígado no mostró alteraciones de la estructura normal del tejido. Sin embargo, los hígados de algunos especímenes del grupo que consumió pienso comercial mostraron una alta inclusión de vacuolas lipídicas tanto en la zona periductular como en la no periductular, presentando una apariencia de esteatosis hepática en esas muestras (tras 60 días de consumo de pienso comercial). En cualquier caso, este grupo no mostró diferencias significativas en el porcentaje de área lipídica en comparación con el grupo control. Este resultado concuerda con la ausencia de diferencias significativas en el contenido de lípidos totales obtenido en el análisis de ácidos grasos. Nuestros resultados son similares a los encontrados por Mourente et al. (2005) en lubina, quien informó de que la ingesta de una dieta fabricada con aceite de lino, rico en LNA y LA, no provocaba cambios en la estructura hepática. Sin embargo, los peces que se alimentaron con una dieta fabricada con aceite de colza, rico en OA y LA, mostraron una gran variabilidad en el tamaño y número de gotas lipídicas en los hepatocitos, sin patología asociada. Del mismo modo, otro estudio llevado a cabo en tilapia (*Oreochromis* sp.) no mostró alteraciones histológicas del hígado debido a la ingesta de aceites vegetales (Ng et al. 2013).

5. Conclusión

Los resultados indican que los juveniles de mújol, cuya dieta natural se ha visto modificado por el consumo de un pienso comercial, muestran diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos en los tres tejidos estudiados, aunque la magnitud y el tiempo necesarios para mostrar cambios en los ácidos grasos individuales difieren entre ellos. El músculo reflejó más rápidamente (30 días) los cambios en los porcentajes de ácidos grasos, seguido por el hígado, mientras que el cerebro mostró signos de cambio tras 60 días de consumo de pienso comercial. LA fue el ácido graso que más contribuyó a las diferencias observadas entre grupos, y no recuperó los valores obtenidos en el grupo control incluso tras dos meses de lavado con dieta natural. La velocidad a la que cambia el músculo, y la resistencia del cerebro a los cambios los convierte en buenos para el análisis de ácidos grasos, siendo una importante herramienta ecológica para el rastreo de consumo temporal de piensos ricos en aceites vegetales. La funcionalidad del hígado no parece verse alterada por los cambios de dieta mencionados y por los cambios en los perfiles de ácidos grasos. Los juveniles salvajes de mújol deben poder adaptarse su fisiología a las nuevas condiciones dietéticas cuando llegan por primera vez a las inmediaciones de las piscifactorías. Sin embargo, el hecho de migrar a zonas alejadas no garantiza la recuperación de su perfil natural de ácidos grasos. Pueden existir efectos a largo plazo derivados de esta situación, por lo que se recomienda un mayor control sobre las pérdidas de pienso para peces con el fin de asegurar a las poblaciones de peces salvajes un crecimiento y fisiología adecuados.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestra gratitud a James T. Dick, Douglas R. Tocher, Matthew Sprague y a todo el equipo del Grupo de Nutrición del Institute of Aquaculture (University of Stirling) por su sus consejos y ayuda con el análisis de ácidos grasos. También estamos agradecidos a Ander Montoya y David Verdiell por su apoyo la captura de los peces y en la determinación taxonómica, y a Emilio Cortés por sus consejos sobre las dietas. Este trabajo está subvencionado por el proyecto FATFISH CTM2009-14362-C02-02 y por una beca FPI del Ministerio de Economía y Competitividad (España).

Chapter 2

Obtention of adequate sequences for gene expression analysis of genes related to fatty acid metabolism.

1. Introduction

Current reared fish species are mainly carnivorous species, which nutritional requirements were fulfilled in the past thanks to the addition of fish meal and fish oils to the aquafeeds. Nevertheless, the need of a sustainable aquaculture industry, together with the fact of fluctuating prices of those raw materials, have lead to the producers to partially substitute fish meal and fish oil by new alternative sources of proteins and oils (Naylor et al. 2000; De Silva et al. 2011). The most sustainable and economically stable solution was the use of vegetable protein and oils, due to their low prices and the fact that terrestrial plant oils can be produced in sufficient quantities to meet current aquaculture demands (Naylor et al. 2009). Unfortunately, vegetable oils are poor in long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) like arachidonic acid (20:4n-6; ARA), eicosapentaenoic acid (20:5n-3; EPA) and docosahexaenoic acid (22:6n-3; DHA) (Watanabe 2002), which in general, are essential nutrients for carnivorous marine fish (Tocher 2003), as they cannot synthesize them in sufficient manner from their precursors, linoleic acid (18:2n-6; LA) and α -linolenic acid (18:3n-3; LNA). Nonetheless, this is not the case of herbivorous freshwater fish species, which use to be able to generate sufficient amounts of ARA from LA, and EPA and DHA from LNA. The loss of this capacity in marine fish may be due to selective pressure by the availability of fatty acids in the different environments where they live. Primary producers in marine habitats produce high amounts of the n-3 LC-PUFA EPA and DHA, whereas fresh water phytoplankton produce mainly LA and LNA (Tocher 2010). In this way, marine fish have access to a diet rich in n-3 fatty acids, as primary producers in the marine environment can produce them in large quantities, and so the evolution has not preserve intact the functionality of the elongases and desaturases responsible from the generation of LC-PUFA from the n-3 series. On the other hand, natural diets of freshwater fish are rich in LA and LNA, being necessary an optimum functionality of the mentioned enzymes to ensure sufficient amounts of the essential fatty acids, scarce in their environment.

The reduced functionality of desaturases seems to be a generalized characteristic of carnivorous marine fish. Nevertheless, this could not be true in herbivorous/omnivorous and amphidromous fish, which are able to live in both marine and freshwater areas, as it is the case of the golden mullet *Liza aurata* (Risso 1810). This species is known to be

aggregated around fish farm sea-cages, where they feed in lost pellets rich in n-6 fatty acids, modifying their natural fatty acid profiles (Arechavala-Lopez et al. 2010; Fernandez-Jover et al. 2009). Fatty acids are important structural components of the cell membranes (Cossins and MacDonald 1989; Hazel and Williams 1990; Sargent et al. 2002), they are precursors of a variety of autocrine molecules related with inflammation process and immune status (Calder 2006; Calder 2007; Kelley and Rudolph 2000; Russo 2009; Tocher 2003), and they have a role in the maintenance of the lipid homeostasis through interaction with nuclear receptors NF κ B, PPARs (peroxysome proliferator activated receptors) and SRBEP (sterol regulatory element binding protein), which regulate gene expression and affects to the lipid metabolism, besides cellular differentiation and inflammatory responses among others (Hwang and Rhee 1999; Schmitz and Ecker 2008; Tocher 2003). In the previous chapter of this thesis, it was remarked that brain of golden mullet *Liza aurata* (Risso, 1810) could be able to elongate and desaturate LA to ARA when the dietary intake of the last one is not enough to fulfill the brain requirements. The aim of this chapter was the search for adequate primers sequences of specific elongase (elongase 5; elov15) and desaturase (Δ 6 desaturase; 6FAD) from golden mullet, for future uses in real time quantitative PCR (RT-qPCR) to check for alterations in the expression of gene encoding for these enzymes.

2. Material and methods

2.1 Tissue sampling

Wild specimens of golden mullet were captured in the Mar Menor lagoon, Murcia, south-east of Spain. Fish were immediately sacrificed and liver fragments were removed and stored in RNA lysis solution (Sigma-Aldrich). At the arrival to the laboratory, samples were weighed and 100 mg of liver were taken for RNA extraction.

2.2 RNA extraction

Liver fragments of adequate weight were placed in Tri reagent® prior to homogenization with a mini beadbeater (Biospec Inc. –Thistle Scientific, Uddingstone, Glasgow, UK) for 10 minutes. After homogenization, 100 µl of 1-bromo-3-chloropropan (BCP) were added to the samples, and tubes were shaken and incubated for 15 minutes at room temperature. Samples were centrifuged to separate the components in three different layers (14000 g for 15 min at 4°C), and the upper layer was collected and placed in fresh tubes. The precipitation of the RNA was carried out by the addition of 250 µl of cold RNA precipitation solution (1.2 M NaCl and 0.8 M sodium citrate sesquihydrate dissolved in 50 ml of distilled water) and 250 µl of cold isopropanol. Samples were mixed and incubated at room temperature for 10 minutes, followed by centrifugation at 14000 g for 15 minutes at 4°C. The supernatant was removed and RNA pellets washed twice with 1 ml ice-cold 75% ethanol (v/v). Samples were vortexed and centrifuged (7500 g for 5 minutes at 4°C), ethanol was removed and samples air dried until ethanol was completely evaporated. The RNA pellets were resuspended in 30 µl of RNase-free water and incubated for 30 minutes at room temperature, lightly shaking the tubes every 10 minutes to facilitate the dissolution of the pellet.

A ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (Labtech Int., East Sussex, UK) was used to measure quantity of RNA by determination of the ratio of absorbances at 260/280 and 260/230 nm, and the RNA quality was assessed by gel electrophoresis using a 1% agarose gel prepared with 0.25 gr of agarose (Multi ABgarose, Thermo Scientific, UK) dissolved in 25 ml TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8) and 0.8 µl of ethidium bromide at a concentration of 5 mg ml⁻¹. Gels were visualized and

photographed using the Ingenius Syngene BioImaging system (Cambridge, UK). Samples were stored at -80°C.

2.3 RNA reverse transcription

RNA samples were measured for second time in the Nanodrop, and 2000 ng of RNA were transferred to sterile RNase-free test tubes, followed by the addition of RNase-free water to get a final volume of 10 µl. Samples were heated at 75°C for 5 min, and then cooled down on ice for 5 min for preventing secondary structures in the RNA molecules. The following RT master mix was added to the cold samples: 2 µl of 10× RT buffer, 0.8 µl of 25× dNTP mix (100 mM), 1.5 µl of 10× RT random primers, 0.5 µl of Oligo DT primers, 1 µl of reverse transcriptase, and 4.2 µl of RNase free water. Samples were vortexed and centrifuged at 460 g for 1 minute. Four control tubes were prepared following the same instructions, but two of them without the enzyme and adding 5.2 µl of RNase-free water instead, and the other tube without sample and enzyme, and completing the final volume by the addition of RNase-free water. Prior to the addition of the master mix, the tubes were placed in a thermocycler (Biometra® Tgradient, Goettingen, Germany) and incubated at 70°C for 5 minutes to denaturalize the RNA. Then, samples were placed again in the thermocycler (cycle programming in [table 1](#)) The cDNA produced was diluted in 1:20 with RNase free water, checked for quantity in the Nanodrop and stored at -20°C.

Table 1. Thermocycler programming for the reverse transcription.

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	30 sec	30
Annealing	56°C-58°C-60°C	30 sec	
Extension	72°C	1 min	
Final extension	72°C	5 min	1

2.4 PCR reactions and DNA purification

After alignment of sequences of the gene of interest from several fish species (Bioedit software, [Hall 1999](#)), adequate primers were designed on common conserved regions using Primer3 software ([Rozen and Skaletsky 2000](#)). The following master mix was added to the tubes: 0.3 µl each of forward and reverse primers, 5 µl polymerase enzyme (MyTaq™ Mix, Bioline), 1 µl of purified cDNA. Reaction conditions for all PCR

assays are described in [table 2](#). All PCR reactions included no-template negative controls (DNase-free water). Final PCR products were visualized in a gel as described in section 2.2.

The amplified DNA products were excised from the gel using a clean, sharp scalpel, and purified (QIAquick Gel Extraction Kit, Quiagen, Manchester, U.K.) and sequenced (Sanger ABI3730x1, GATC Biotech, Konstanz, Germany) to check the correspondence with the gene of interest. Phylogenetic trees were constructed using the neighbour-joining method ([Saitou and Nei, 1987](#)), and the analysis were conducted in MEGA6 ([Tamura et al. 2013](#)). The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method ([Zuckerkandl and Pauling 1965](#)) and are in the units of the number of amino acid substitutions per site.

Table 2. PCR reaction settings.

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	95°C	1 min	1
Denaturation	95°C	30 sec	35
Annealing	59°C	30 sec	
Extension	72°C	1 min	
Final extension	72°C	5 min	1

3. Results and discussion

Sequence alignments are shown for elovl5 (figure 1) and 6FAD (figure 2). Obtained primers from the most conserved areas are shown in table 3.

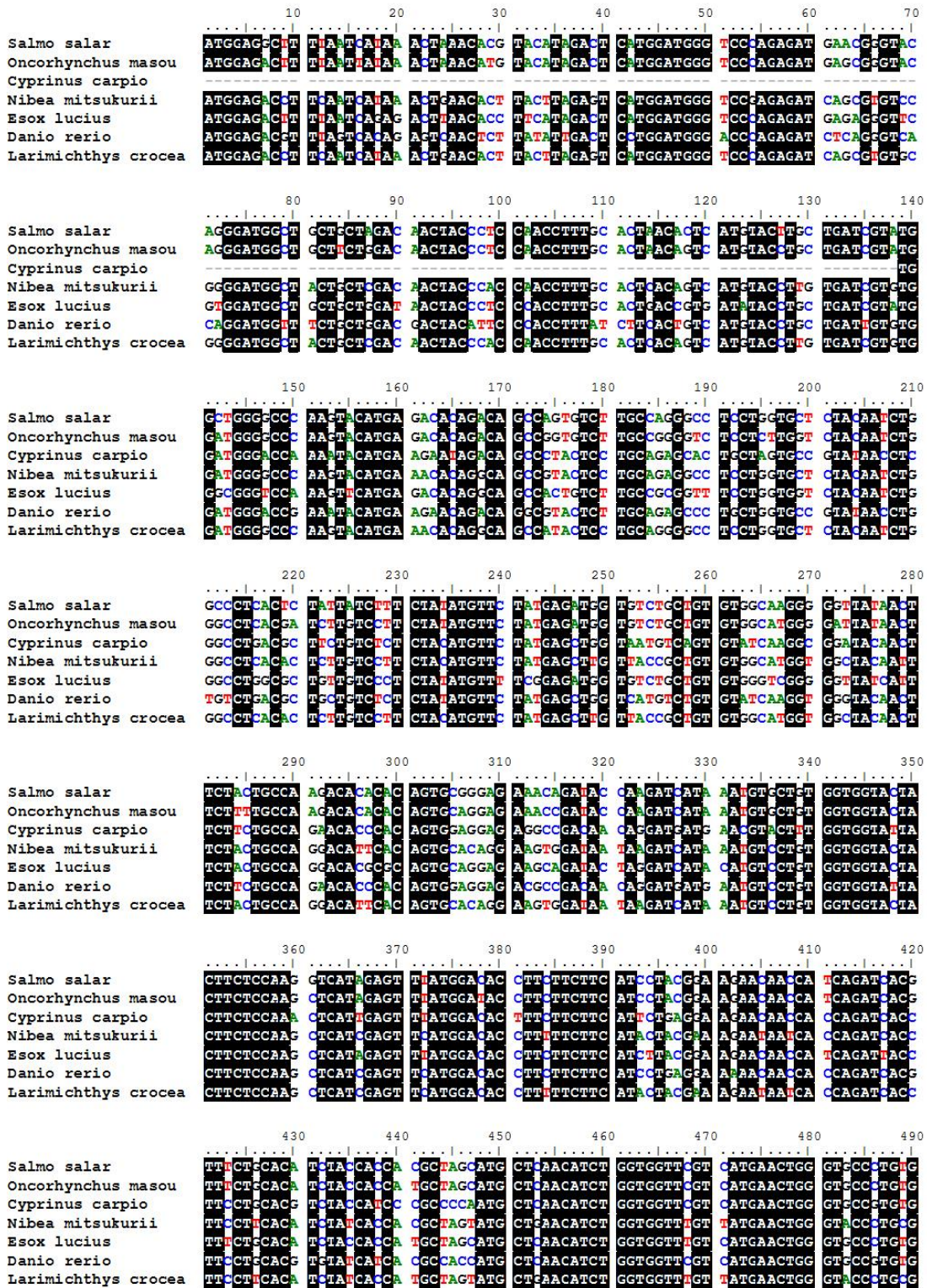


Figure 1. Clustal W2 multiple alignment of the DNA sequences of Elovl5 from several teleost species, including *Salmo salar* (NM_001136552.1), *Oncorhynchus masou* (DQ067616.1), *Cyprinus carpio* (JN204181.1), *Nibeia mitsukurii* (FJ952143.1), *Esox lucius* (JX272634.1), *Danio rerio* (NM_200453.1) and *Larimichthys crocea* (JQ320377.1). Identical residues are shaded black.

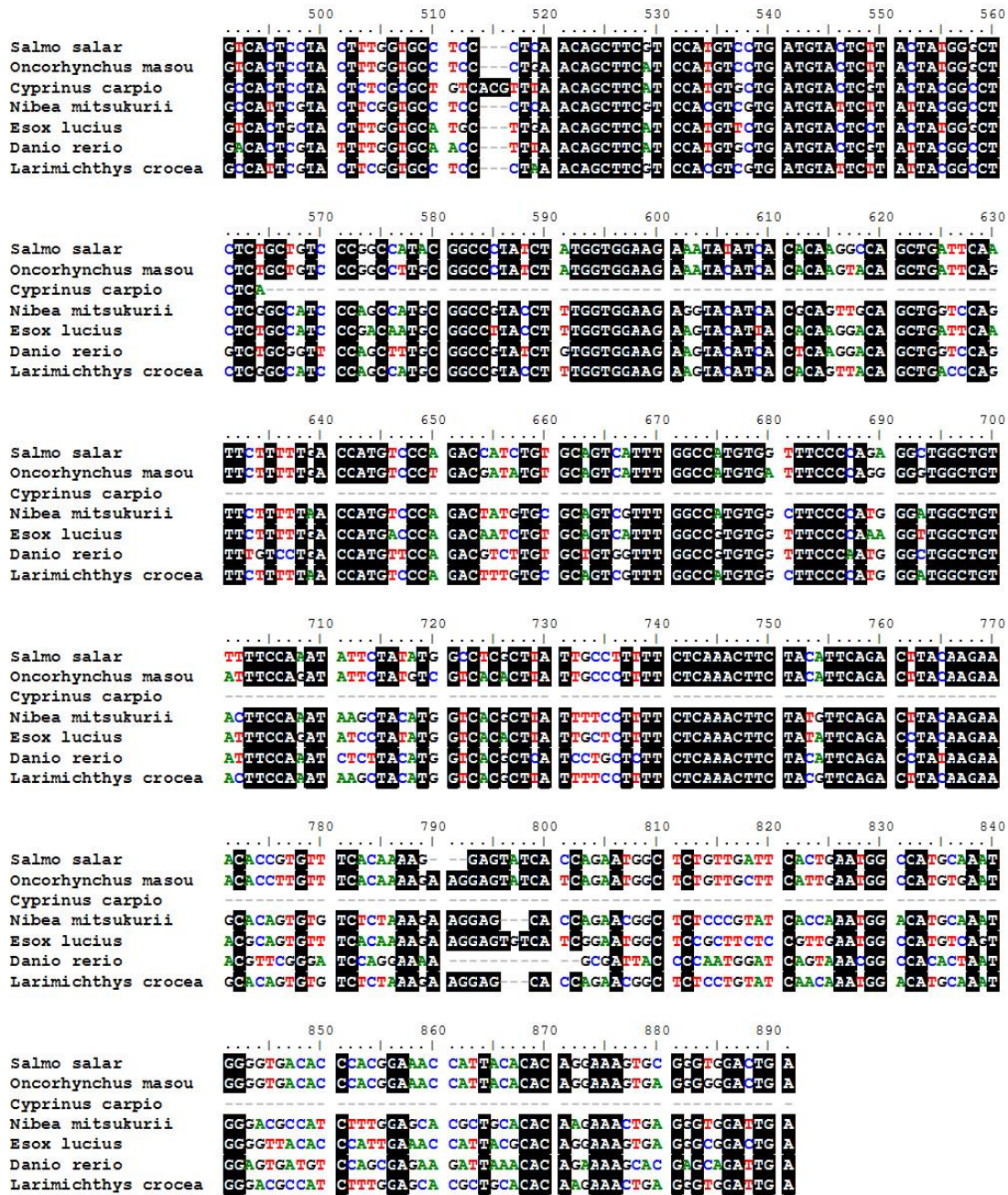


Figure 1. Clustal W2 multiple alignment of the DNA sequences of Elov15 from several teleosts species, including *Salmo salar* (NM_001136552.1), *Oncorhynchus masou* (DQ067616.1), *Cyprinus carpio* (JN204181.1), *Nibeia mitsukurii* (FJ952143.1), *Esox lucius* (JX272634.1), *Danio rerio* (NM_200453.1) and *Larimichthys crocea* (JQ320377.1). Identical residues are shaded black (continued).



Figure 2. Clustal W2 multiple alignment of the DNA sequences of 6FAD from several teleosts species, including *Rachycentron canadum* (FJ440238.1), *Oreochromis niloticus* (KF268464.1), *Lates calcarifer* (GQ214179.1), *Dicentrarchus labrax* (EU647692.1), *Epinephelus coioides* (EU715405.1), *Sparus aurata* (GQ162822.1), and *Pagrus major* (AB298553.1). Identical residues are shaded black.

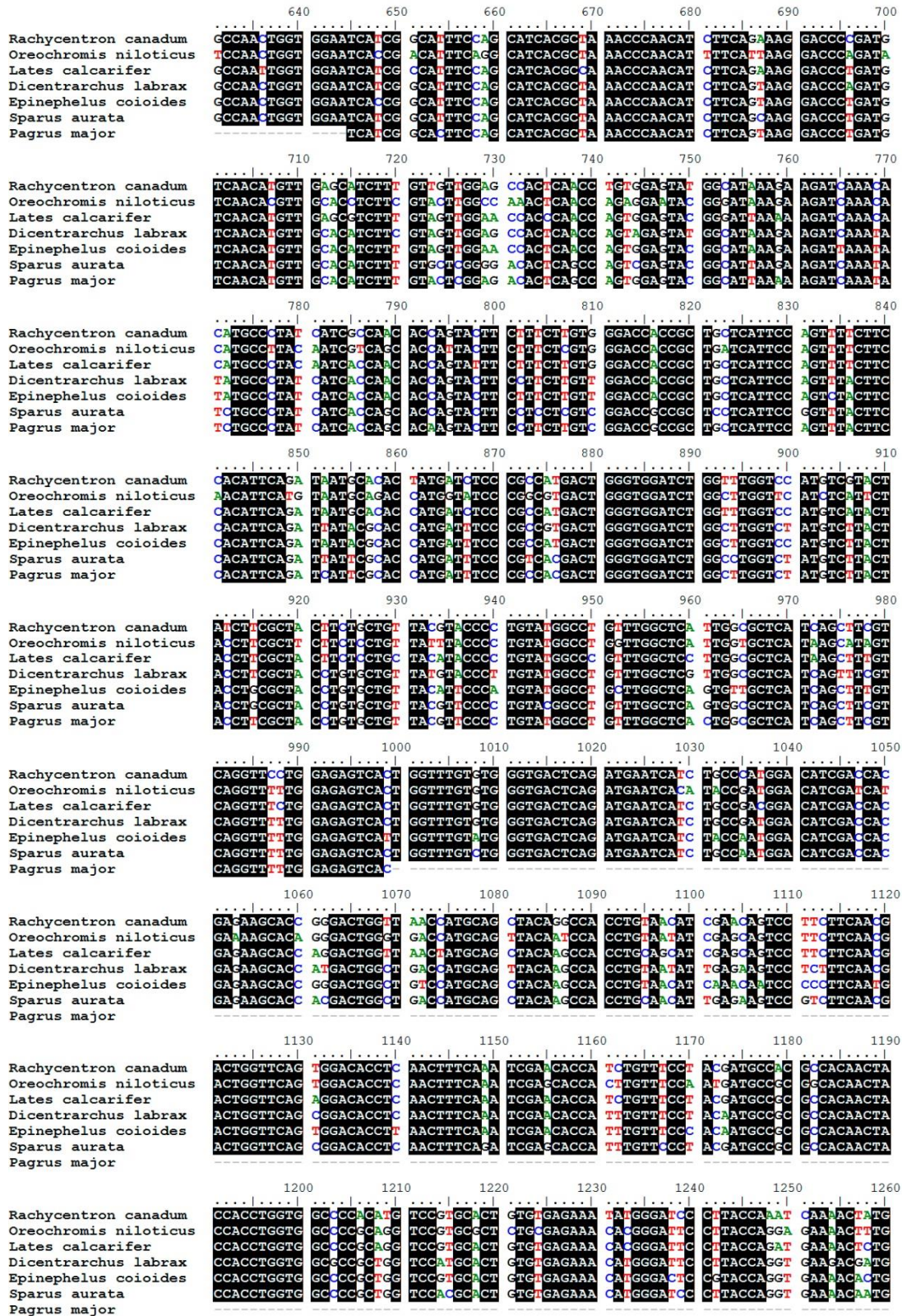


Figure 2. Clustal W2 multiple alignment of the DNA sequences of 6FAD from several teleosts species, including *Rachycentron canadum* (FJ440238.1), *Oreochromis niloticus* (KF268464.1), *Lates calcarifer* (GQ214179.1), *Dicentrarchus labrax* (EU647692.1), *Epinephelus coioides* (EU715405.1), *Sparus aurata* (GQ162822.1), and *Pagrus major* (AB298553.1). Identical residues are shaded black (continued).

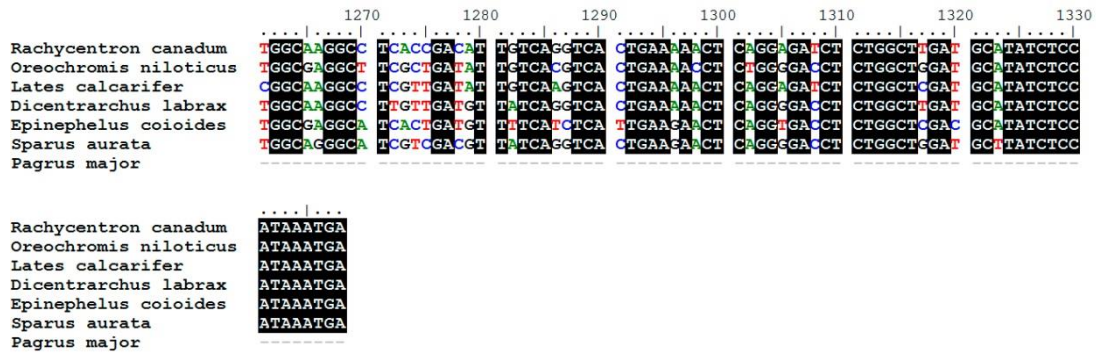


Figure 2. Clustal W2 multiple alignment of the DNA sequences of 6FAD from several teleosts species, including *Rachycentron canadum* (FJ440238.1), *Oreochromis niloticus* (KF268464.1), *Lates calcarifer* (GQ214179.1), *Dicentrarchus labrax* (EU647692.1), *Epinephelus coioides* (EU715405.1), *Sparus aurata* (GQ162822.1), and *Pagrus major* (AB298553.1). Identical residues are shaded black (continued).

Table 3. Details of PCR primers. The data include sequences and annealing temperature (Ta) for primer pairs and amplicon sizes.

Primer sets	Sequence (5'-3')	Ta (°C)	Amplicon size (bp)
Liza_Elov15_F1	tggtggtactacttctccaa	57.7	402
Liza-Elov15_R1	gtctgaatgtagaagtttga	52.2	
Liza_6fad_F4	aagtttctgaagcccctgc	56.7	428
Liza_6fad_R4	atggtgggttagcgtgatg	55.3	

Based on the obtained conserved regions, appropriate primers for elongase 5 and $\Delta 6$ desaturase were constructed (table 3) and utilized to amplify a section of the cDNA. Primers for elongation factor 1 α (EF1 α) (GeneBank EF555089.1) and cytochrome P450 (CYP) (GeneBank AF072899.1) were also obtained, to used them as housekeeping gene. The obtained fragments were sequenced, and nucleotides and aminoacids sequences are shown next.

EF1 α (housekeeping gene)

DNA sequence (124 bp):

CAGTTCCTTTAGGCAGCACCTATGCACCGACCACTGTCGTTCTTGCTGGG
TGGGTTCCGACACTCTCGAAGTTACGGGTCCAGTAGTAGGACTTGGTG
GGACCGGTCTAGTTGCTCCCTATGC

Predicted protein sequence (5'-3' frame 2):

SSFRQHLCTDHCRCWVGSDDSRSYGSSSRTWWDRSSCSLCVPLGSTYAPT
TVVLAGWVPTTLEVTGPVVGLGGTGLVAPY

CYP (housekeeping gene)

DNA sequence (110 bp):

```
CCTGAGTCTCACCGAGATGAGCAAGCGCTACGGCAATGTGTTCCAGATC  
CAGATCGGCATGCGTCCTGTCGTCGTTTTGAGCGGCAATGAAACGGTTC  
GACAGGCTCTCA
```

Predicted protein sequence (5'-3' frame 2):

```
LSLTEMKRYGNVFIQIGMRPVVLSGNETVRQAL
```

Elovl5

DNA sequence (379 bp):

```
TGGTGGTACTACTTCTCCAAGCTCATCGAGTTCATGGACACCTTCTTCTT  
CATCCTGCGAAAGAATAATCACCAGATCACATTTCTTCACATCTACCACC  
ACGCCAGCATGCTGAACATCTGGTGGTTCGTCATGAACTGGATACCCTGT  
GGCCACTCATACTTCGGTGCCTCCCTAAACAGCTTCGTCCACGTCGTGAT  
GTATTCTTACTACGGCCTCTCAGCCATTCCAGCCATCCGACCGTATCTAT  
GGTGAAGAAGTACATCACGCAGTTACAGCTGATCCAGTTCTTTTTAACC  
ATGTCCCAGACCATGTTTGCAGTCATATGGCCGTGTGGCTTCCCATACGG  
GTGGCTGTTTCCAATAAGTACAGTCACA
```

Predicted protein sequence (5'-3' frame 1):

```
WYYYFSKLIEMDTFFFILRKNNHQITFLHIYHHASMLNIWWFVMNWIPCG  
HSYFGASLNSFVHVVMYSYYGLSAIPAIRPYLWWKKYITQLQLIQFFLTMSQ  
TMFAVIWPCGFPYGWLFPNKYSH
```

6FAD

DNA sequence (378 bp):

```
AGCCTCTGCTGATTGGAGAGTTGGCGGCGACAGAGCCCAGCCAGGACCG  
AAATAAAAATGCAGCGATCATAACAGGATTTCAACACCCTGCGAGTACAG  
GTGGAGAACGCGGGCCTTTTCCGAGCTTCCCCTTTGTTCTTCTGCCTCCA  
TCTGGGCCACATCCTGCTGCTGGAGGCCCTGGCGTGGCTGATAATCTGGC  
ACTGGGGTACGAGCTGGACGCTGACCATCCTGTGCTCGGTCATACTGGC  
AACTGTTTCAAGTCCAAATGGAACCATCTGTTGCAGAAGTTCATCATC  
CTGTCTTCAAGAAGTCCAAATGGAACCATCTGTTGCAGAAGTTCATCATC  
TGGTCATTAAAGGGAGCTCTGCCAACTGGTG
```

Predicted protein sequence (5'-3' frame 3):

PLLIGELAATEPSQDRNKNAAIHQDFNTRLRVQVENAGLFRASPLFFCLHLGHI
 LLEALAWLIWHWGTSWTLTILCSVILATVQLQAGWLQHDFGHLSVFKKS
 KWNHLLQKFIIWSLKGALPTG

Elov15 and 6FAD sequences correspond to open reading frames (ORF) both encoding for sequence of aminoacids which shows homology with teleost and mammalian orthologues (figures 3 and 4).

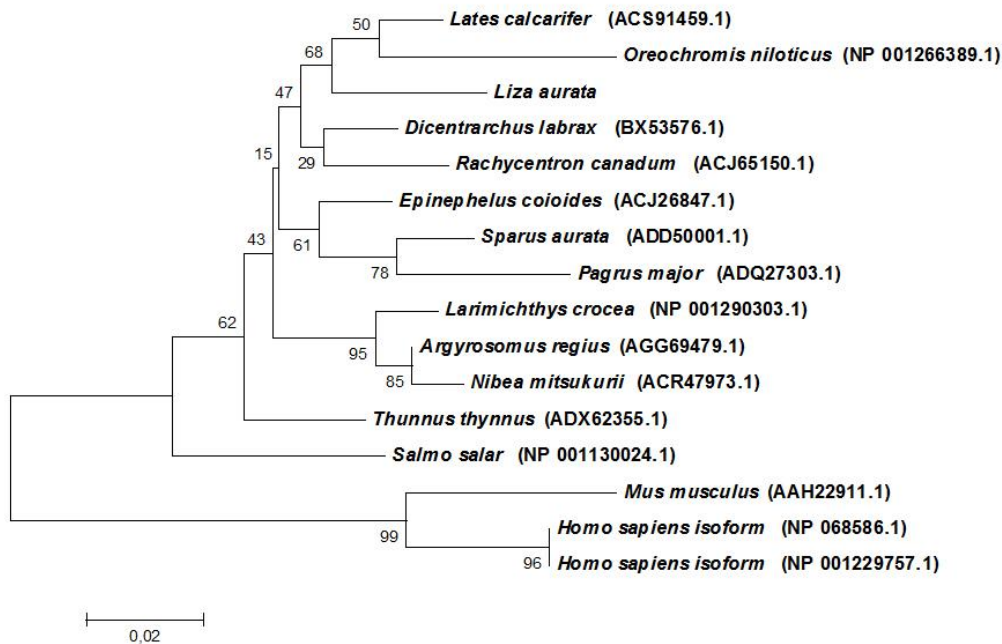


Figure 3. Phylogenetic tree comparing the deduced amino acid sequences of elov15 of *Liza aurata*, *Epinephelus coioides* (ACJ26847.1), *Dicentrarchus labrax* (CBX53576.1), *Argyrosomus regius* (AGG69479.1), *Nibea mitsukurii* (ACR47973.1), *Lates calcarifer* (ACS91459.1), *Rachycentron canadum* (ACJ65150.1), *Oreochromis niloticus* (NP_001266389.1), *Sparus aurata* (ADD50001.1), *Larimichthys crocea* (NP_001290303.1), *Salmo salar* (NP_001130024.1), *Thunnus thynnus* (ADX62355.1), *Pagrus major* (ADQ27303.1), *Mus musculus* (AAH22911.1), and Elov15 isoform 1 (NP_068586.1) and isoform 2 (NP_001229757.1) of *Homo sapiens*. The numbers on the branches represent the frequencies (%) with which the presented tree topology was obtained after bootstrapping (10,000 iterations). Accession numbers from Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

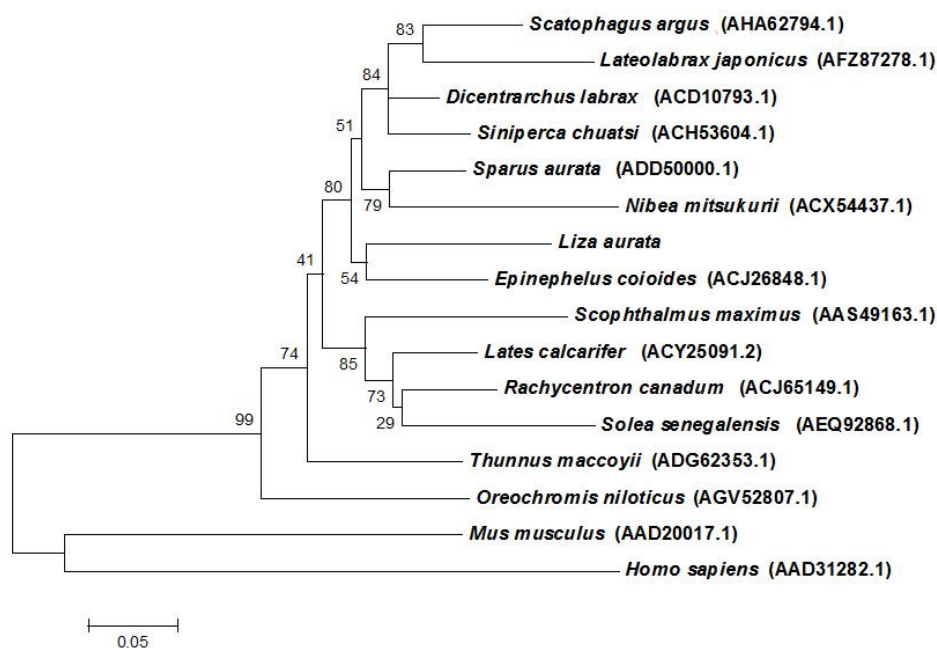


Figure 4. Phylogenetic tree comparing the deduced amino acid sequences of 6FAD of *Liza aurata*, *Epinephelus coioides* (ACJ26847.1), *Dicentrarchus labrax* (CBX53576.1), *Argyrosomus regius* (AGG69479.1), *Nibea mitsukurii* (ACR47973.1), *Lates calcarifer* (ACS91459.1), *Rachycentron canadum* (ACJ65150.1), *Oreochromis niloticus* (NP_001266389.1), *Sparus aurata* (ADD50001.1), *Larimichthys crocea* (NP_001290303.1), *Salmo salar* (NP_001130024.1), *Thunnus thynnus* (ADX62355.1), *Pagrus major* (ADQ27303.1), *Mus musculus* (AAH22911.1), and Elov15 isoform 1 (NP_068586.1) and isoform 2 (NP_001229757.1) of *Homo sapiens*. The numbers on the branches represent the frequencies (%) with which the presented tree topology was obtained after bootstrapping (10,000 iterations). Accession numbers from Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

The obtained sequences of Elov15 and 6FAD allowed us to design primers corresponding to fragments of adequate length for qPCR analysis (table 4). Those primers are susceptible of being used in experiments implying gene expression of elongase 5 and $\Delta 6$ desaturase of *L. aurata*, which could shed light on the question of ARA synthesis in brain of this species.

Table 4. Proporsed primers for qPCR analysis. The data include sequences and annealing temperature (Ta) for primer pairs, amplicon sizes and accession numbers.

Primer sets	Sequence (5'-3')	Ta (°C)	Amplicon size (bp)	Accession n°
Liza_EF1a_F1	acgtgtccgtcaaggaaatc	57.3	194	EF555089.1*
Liza_EF1a_R1	gaccagctccttgaactgc	59.4		
Liza_CYP_F1	ggcagcagaccttacctgag	61.4	195	AF072899.1*
Liza_CYP_R1	actctggcctcgctgataa	57.3		
Liza_Elov15_F1	ccctgtggccactcactt	59.4	172	
Liza-Elov15_R1	acatggtctgggacatggtt	57.3		
Liza_6fad_int_F1	tcaacaccctgagtagacag	59.9	167	
Liza_6fad_int_R1	cagtatgaccgagcacagga	59.9		

* GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Acknowledgements

Thanks are given to Laura Martínez Rubio (University of Stirling) for her advice about the work, and special thanks are given to Mónica Betancor (University of Stirling) for her patience and guidance in the laboratory work. Thanks are also given to David Verdiell and Rubén Rabadán Ros (University of Murcia) for their help sampling fish. This work was funded by the project FATFISH CTM2009-14362-C02-02 and FPI predoctoral grant from Ministerio de Economía y Competitividad (Spain).

Chapter 3

La sustitución de una alimentación natural por un pienso comercial modifica el perfil lipídico del músculo y el estado inmune en juveniles de *Liza aurata* (Risso, 1810).

1. Introducción

Las actividades acuícolas se han incrementado en magnitud en las últimas décadas y se espera que continúen haciéndolo en el futuro. El crecimiento de esta industria conlleva el aumento en el número de piscifactorías instaladas en mar abierto. Éstas actúan como FADs (Fish Aggregation Devices en sus siglas en inglés), atrayendo a un gran número de especies de peces salvajes y macroinvertebrados, los cuales aprovechan la protección de la que les proveen las estructuras de las jaulas, así como la disponibilidad de alimento rico en energía en forma de excedente de pienso (Dempster et al. 2002; Gonzalez-Silvera et al. 2015; Sanchez-Jerez et al. 2011; Vita et al. 2004). Por lo tanto, se teme que esta situación pueda modificar el comportamiento alimenticio de estas especies y su nutrición.

En años recientes, los peces cultivados han sido alimentados con piensos ricos en aceites vegetales, los cuales representan una alternativa económica y sostenible al uso de aceites de pescado. Los aceites vegetales son ricos en ácidos grasos pertenecientes a la serie n-6, como el ácido linoleico (18:2n-6; LA), aunque el ácido α -linolénico (18:3n-3; LNA), de la serie n-3, también es abundante en algunas plantas. Sin embargo, los aceites vegetales presentan una deficiencia en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y altamente insaturados (HUFA) como el ácido araquidónico (20:4n-6; ARA), y otros pertenecientes a la familia n-3 como son el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3; EPA) y el ácido docosahexaenoico (22:6n-3; DHA), los cuales son abundantes en aceites de pescado (Turchini et al. 2010). ARA, EPA y DHA son ácidos grasos esenciales para peces marinos y por lo tanto tienen que obtenerlos de la dieta, debido a la incapacidad de estos para elongar y desaturar sus precursores, LA y LNA (Sargent et al. 2002; Tocher 2003). Por lo tanto, un cambio de una dieta natural por el consumo de un pienso comercial en forma del excedente de las jaulas puede causar un efecto en los peces salvajes que viven asociados a las piscifactorías, debido a la retención de los ácidos grasos de origen vegetal en las membranas celulares de los peces, a expensas de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como DHA y EPA. Este hecho debe llevar a cambios en diferentes procesos fisiológicos que estén influenciados por los porcentajes de ácidos grasos en el organismo.

La tendencia actual es la sustitución de los aceites de pescado por aceites vegetales, aunque la cantidad de aceites de pescado que se puede sustituir varía mucho en función de la especie, y una sustitución excesiva puede conllevar efectos adversos en los peces cultivados. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que la sustitución completa disminuye el crecimiento de juveniles (Montero et al. 2003; Peng et al. 2008), aunque la mayoría de los trabajos confirman que la sustitución parcial, entre el 60 % y el 80 %, no afecta significativamente al crecimiento del pez (Peng et al. 2008; Mourente et al. 2005; Hernández et al. 2007; Fontoulaki et al. 2009). Sin embargo, el estado nutricional del pez, en el que influyen los ácidos grasos de la dieta, es uno de los principales factores que influyen en la respuesta inmune, modulando la resistencia a patógenos. En general, un aumento en la concentración de n-3 PUFA en la dieta de los peces puede tener efectos beneficiosos y también nocivos, pero el balance entre los HUFA n-3 y n-6 de la dieta suele ser el factor más importante en relación a la respuesta inmune y resistencia a enfermedades (Kiron et al. 2012). Por ejemplo, ejemplares de lubina (*Dicentrarchus labrax*) que fueron alimentados con dietas que incluían aceites vegetales, mostraron una reducción significativa en el número total de leucocitos circulantes así como una reducción de la capacidad de los macrófagos para generar el estallido respiratorio (Mourente et al. 2005), mientras que en dorada (*Sparus aurata*), una dieta similar no afecta ni al hematocrito ni al contenido de hemoglobina, lisozima en suero, y estallido respiratorio de los macrófagos, y reduce el número de glóbulos rojos circulantes, así como la actividad fagocítica, la vía alternativa del complemento y la actividad bactericida, e incrementa la expresión en intestino y en riñón cefálico de citoquinas proinflamatorias y genes Mx del hígado (Montero et al. 2003; 2008; 2010). La conexión entre los ácidos grasos de la dieta y la respuesta inmune está mediada principalmente por los eicosanoides, moléculas altamente activas con un gran rango de efectos fisiológicos, incluyendo la regulación del metabolismo lipídico y la mediación en procesos inflamatorios y respuesta inmune (Calder 2007; Trichet 2010). No solo los eicosanoides, si no que también el efecto de los ácidos grasos sobre la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares (Leray et al. 1986) puede estar relacionado con la función inmune, modificando la expresión y la distribución de proteínas y receptores de la superficie de la célula, y alterando el grado de interacción entre los leucocitos y las células endoteliales (Jenski and Stilwell 2001; Calder 2006) así como la capacidad fagocítica (Calder 1990).

Este estudio se desarrolló asumiendo que los ácidos grasos de origen vegetal deben incorporarse a la dieta de los peces salvajes agregados a piscifactorías, a través del consumo de excedente de pienso y heces (Fernandez-Jover et al. 2007; 2008), y que la relación n-3/n-6 debe verse alterada, afectando al sistema inmune. Nuestro objetivo fue estudiar, en condiciones controladas, el posible efecto de un cambio de dieta natural por el consumo de un pienso comercial, tanto en el perfil de ácidos grasos como en parámetros indicativos del estado inmunológico de juveniles de *Liza aurata* (Risso, 1810) – una especie muy apreciada por los consumidores en la zona del Mediterráneo, la cual presenta un comportamiento de agregación alrededor de las instalaciones acuícolas (Fernandez-Jover et al. 2009; Arechavala-Lopez et al. 2010).

2. Material y métodos

2.1 Mantenimiento de los peces

Cuarenta y dos juveniles salvajes del mugílido *L. aurata* fueron capturados en el Mar Menor (Murcia, costa sureste de España), y se mantuvieron en cubas de agua salada en recirculación (250 l) en la Universidad de Murcia. La temperatura del agua se mantuvo a 19 ± 2 °C con una tasa de flujo de agua de 700 l h^{-1} y 33‰ de salinidad. El fotoperiodo fue de 12 h luz : 12 h oscuridad y los peces ingirieron una dieta para peces omnívoros (Tabla 1) hasta el inicio del experimento (3 meses de aclimatación). Esta dieta natural fue preparada de acuerdo a las indicaciones de Goemans e Ichinotsubo (2008) para dietas omnívoras, con algunas modificaciones hechas por el equipo del Acuario de la Universidad de Murcia. Ambos piensos fueron triturados y mezclados con gelatina, y congelados a -20 °C.

2.2 Diseño experimental

Los peces se distribuyeron aleatoriamente en dos cubas idénticas con 21 peces en cada una, cada cuba para cada tipo de tratamiento ya que ese diseño experimental ha sido validado en otros estudios (Díaz-Rosales et al. 2007; Salinas et al. 2008). Los peces de una cuba recibieron la misma dieta natural para omnívoros (grupo control) mientras que los peces del otro tanque (grupo pienso comercial) fueron alimentados con un pienso comercial (D4 protec, Skreeting). El tipo de pienso comercial fue elegido debido a su utilización en estudios de campo previos con peces agregados a jaulas (Fernandez-Jover et al. 2009), y este se trituró y mezcló con gelatina, ya que los peces no eran lo suficientemente grandes como para alimentarse de los pellets. Ambos grupos fueron alimentados una vez a medio día a un 3 % de peso corporal dia^{-1} . Se muestrearon nueve peces por cuba tras dos y ocho semanas del cambio de dieta, con el fin de detectar cambios en parámetros inmunológicos a corto y largo plazo. Los peces se mantuvieron en ayunas durante las 24 h previas a la toma de muestras.

2.3 Recolección de muestras

Los peces se muestrearon en condiciones estériles y se anotó el peso y la longitud totales. Se obtuvieron muestras de sangre de la vena caudal de cada espécimen con una aguja de calibre 27 y una jeringuilla de 1 ml. Tras coagular a 4 °C, cada muestra se centrifugó para obtener el suero, que se congeló a -80 °C hasta el momento de realizar

los análisis. El riñón cefálico se cortó en pequeños fragmentos que se transfirieron a 8 ml de sRPMI [medio de cultivo RPMI-1640(Gibco) suplementado con cloruro de sodio al 0,35 %, 2 % de suero bovino fetal (FCS, Gibco), 100 u. i. ml⁻¹ de penicilina (Flow) y 100 mg ml⁻¹ de estreptomina (Flow)] para el aislamiento de leucocitos, tal como ha sido descrito por [Esteban et al. \(1998\)](#). Se obtuvieron suspensiones de leucocitos forzando el paso de los fragmentos del órgano a través de una malla de nylon (100 mm de tamaño), lavando 2 veces (400 g, 10 min), contando y ajustando a 10⁷ células ml⁻¹ en sRPMI. La viabilidad celular se determinó mediante el test de exclusión de azul trypan. Las muestras de músculo se obtuvieron de la zona antero-dorsal y se congelaron a -80 °C.

Tabla 1. Ingredientes de la dieta natural (gr kg⁻¹) y composición de macronutrientes (% del peso seco) de la dieta natural y del pienso comercial.

Components of natural feed		Composition (dry weight)	Natural feed	Commercial feed
Fishmeal	241.99	Ash	11.36	6.07
Shrimp	323.13	Protein	72.64	58.54
Squid	81.14	Fat	10.41	16.77
Freeze-dried algae	10.96	Nitrogen-free extract	5.60	18.62
Vitamin supplement	14.23			
Red plankton	47.40			
Gelatin	14.23			
Water	266.90			

2.4 Crecimiento

El peso corporal y la longitud de cada pez se midieron al inicio del cambio de dieta. El crecimiento se monitoreó para obtener el peso inicial (Wi), el peso final (Wf), la ganancia de peso (%WG), la tasa específica de crecimiento (SGR), y el factor de condición (CF), los cuales se calcularon para cada grupo de acuerdo a [Silva-Carrillo et al. \(2012\)](#): $CF = (\text{peso longitud}^{-3}) \times 100$; $SGR = [(\text{Ln peso final} - \text{Ln peso inicial}) / \text{número de días}^{-1}] \times 100$; y $\%WG = ((Wf - Wi) / Wi) \times 100$.

2.5 Determinación del perfil de ácidos grasos del músculo

Los ácidos grasos se extrajeron de 0,5-1,0 g de músculo, mediante su homogeneización en 20 ml de cloroformo/metanol (2:1 v:v) con un homogeneizador de tejidos Ultra

Turrax (IKA ULTRA-TURRAX T 25 digital, IKA-WERKE). Los lípidos totales se obtuvieron de acuerdo al método de [Folch et al. \(1957\)](#) y las impurezas no lipídicas se eliminaron lavando con KCl al 0,88 % (p/v). El peso de los lípidos obtenidos se determinó gravimétricamente tras la evaporación del solvente y el desecado de la muestra durante toda la noche en vacío. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs) se obtuvieron mediante transesterificación ácida de los lípidos totales de acuerdo con el método descrito por [Christie \(2003\)](#), y las muestras fueron transmetiladas durante toda la noche en una mezcla de 2 ml de ácido sulfúrico al 1 % en metanol (más 1 ml de tolueno para disolver los lípidos neutros) a 50 °C. Los ésteres metílicos se extrajeron dos veces en 5 ml de iso-hexano/dietil éter (1:1 v/v) tras neutralizar con 2 ml de KHCO_3 al 2 %, se desecaron en atmósfera de nitrógeno y se disolvieron de nuevo en 0.1 ml de iso-hexano. Los ésteres metílicos se purificaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) utilizando iso-hexano : dietil éter : ácido acético (90:10:1 v/v/v). Los FAMEs se separaron y cuantificaron mediante cromatografía gas-líquido usando una columna capilar flexible de sílice SP^{TM} 2560 (100m de largo, diámetro interno de 0,25 mm y 0,20 mm de grosor; SUPELCO) in cromatógrafo Hewlett-Packard 5890. La temperatura del cromatógrafo se programó a 5 min a una temperatura inicial de 140 °C, un aumento a 3 °C/min hasta 230 °C, seguido de un aumento a 3 °C/min hasta 240 °C, manteniéndose esta temperatura durante 12 min. Como gas transportador se utilizó helio a una presión de 300 kPa, y los picos se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención con estándares apropiados de ésteres metílicos (Sigma). Las concentraciones individuales de ácidos grasos se expresaron como porcentajes del contenido total.

2.6 Parámetros inmunológicos

2.6.1 Actividad peroxidasa en suero y leucocitos

La actividad peroxidasa en suero o en leucocitos se midió de acuerdo a [Quade y Roth \(1997\)](#). En resumen, se diluyeron 15 μl de suero con 135 μl de solución de Hank (HBSS) sin Ca^{+2} or Mg^{+2} en placas de 96 pocillos de fondo plano. Se les añadieron 50 μl de 20 mM 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina hidrocloreto (TMB, Sigma) y 5 mM H_2O_2 . Para determinar el contenido de peroxidasa en los leucocitos, se lisaron en $\text{sRPMI } 10^6$ leucocitos obtenidos del riñón cefálico con 0,002 % de bromuro de cetiltrimetilamonio (Sigma) y, tras centrifugar (400 g, 10 min), 150 μl del sobrenadante se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos que contenían 25 μl de 10 mM de TMB y 5 mM de

H₂O₂. En ambos casos, la reacción colorimétrica se detuvo tras dos minutos añadiendo 50 ml de ácido sulfúrico 2 M y la densidad óptica se leyó a 450 nm in un lector de placas (BMG labtech-Fluostar galaxy). Como blancos se utilizaron muestras sin suero o sin leucocitos.

Tabla 2. Porcentajes de los ácidos grasos (medias \pm E.S.) de la dieta natural y del pienso comercial.

Fatty acids	Natural diet	Commercial feed
14:0	6.29 \pm 0.20	5.33 \pm 0.11
15:0	0.56 \pm 0.02	0.25 \pm 0.01
16:0	20.39 \pm 0.23	16.76 \pm 0.26
18:0	4.00 \pm 0.05	3.04 \pm 0.08
20:0	0.38 \pm 0.00	0.37 \pm 0.01
22:0	0.00 \pm 0.00	0.31 \pm 0.01
Total saturated	31.63 \pm 0.39	26.06 \pm 0.45
16:1n-7	4.36 \pm 0.10	5.99 \pm 0.03
18:1n-9	9.41 \pm 0.09	20.12 \pm 0.04
18:1n-7	2.17 \pm 0.02	2.62 \pm 0.00
20:1n-9	3.04 \pm 0.05	1.54 \pm 0.01
22:1n-9	0.53 \pm 0.01	0.27 \pm 0.00
24:1n-9	0.76 \pm 0.02	0.38 \pm 0.00
Total monounsaturated	20.28 \pm 0.22	30.92 \pm 0.07
18:2n-6 (LA)	1.74 \pm 0.05	18.74 \pm 0.10
18:3n-6	0.00 \pm 0.00	0.14 \pm 0.07
20:2n-6	0.53 \pm 0.04	0.34 \pm 0.02
20:3n-6	0.31 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00
20:4n-6 (ARA)	2.46 \pm 0.03	0.62 \pm 0.02
22:2n-6	0.64 \pm 0.05	0.68 \pm 0.01
22:4n-6	0.27 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00
Total n-6 PUFA	5.95 \pm 0.07	20.52 \pm 0.09
18:3n-3 (LNA)	0.69 \pm 0.01	2.99 \pm 0.04
18:4n-3	2.58 \pm 0.06	1.21 \pm 0.02
20:3n-3	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
20:5n-3 (EPA)	14.89 \pm 0.16	10.49 \pm 0.20
22:5n-3	1.35 \pm 0.02	1.22 \pm 0.02
22:6n-3 (DHA)	22.64 \pm 0.39	6.58 \pm 0.15
Total n-3 PUFA	42.14 \pm 0.55	22.49 \pm 0.42
Total PUFA	48.09 \pm 0.62	43.02 \pm 0.51

2.6.2 Actividad bactericida

Se utilizaron dos patógenos oportunistas marinos (*Vibrio harveyi* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) y una bacteria no patógena (*Escherichia coli*). Las bacterias se cultivaron en placas con agar a 25 °C en tryptic soy (TSB, Sigma) en el caso de *V. harveyi* y *P. damsela*, y en Luria (LB, Sigma) en el caso de *E. coli*. Tras ello, se diluyeron colonias individuales de 1-2 mm en 5 ml de medio de cultivo líquido, y se cultivaron durante 16 h a 25 °C en un incubador orbital a 200-250 rpm.

La actividad antimicrobiana del suero se determinó evaluando su efecto en las curvas de crecimiento bacterianas utilizando el método de [Sunyer y Tort \(1995\)](#) con algunas modificaciones. Se traspasaron alíquotas de 100 µl de las diluciones bacterianas (1/10) a placas de 96 pocillos de fondo plano y se cultivaron con volúmenes iguales de suero de mújol. La densidad óptica de las muestras se midió a 620 nm a intervalos de 30 minutos durante un periodo de 24 h a 25 °C. Como blancos se utilizaron muestras sin bacterias (control negativo). Como control positivo se utilizaron muestras sin suero (100% de crecimiento o 0% de actividad bactericida).

2.6.3 Actividad fagocítica

La fagocitosis de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa S288C) por parte de los leucocitos de riñón cefálico de *L. aurata* se estudió mediante citometría de flujo tal como describió [Rodríguez et al. \(2003\)](#). Células de la levadura inactivadas por calor y liofilizadas fueron marcadas con fluoresceína isotiocinato (FITC, Sigma), lavadas y ajustadas a 5×10^7 células ml⁻¹ de sRPMI. Las muestras para fagocitosis consistieron en 125 µl de células de levadura marcadas y 100 µl de leucocitos de riñón cefálico en sRPMI (6 células de levadura : 1 leucocito). Las muestras se mezclaron, centrifugaron (400g, 5 min, 22 °C), resuspendidas e incubadas a 22 °C durante 30 minutos. Al final de la incubación, las muestras se colocaron en hielo para detener la fagocitosis, y se añadió a cada muestra 400 µl de tampón fosfato enfriado en hielo (PBS). La fluorescencia de las levaduras extracelulares se extinguió añadiendo 40 µl de azul tripan frío (0,4 % en PBS). En cada ensayo de fagocitosis se incluyeron muestras estándar de *S. cerevisiae* marcadas con FITC o leucocitos de riñón cefálico.

Todas las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (Becton Dickinson) con un láser de ión argón ajustado a 488 nm. Los análisis se llevaron a cabo en 3000 células, que fueron obtenidas a una tasa de 300 células s⁻¹. Los datos se recogieron en forma de dos parámetros, granularidad, por parte de detectores de dispersión lateral (SSC), y tamaño por parte de detectores de dispersión frontal (FSC), y un programa de ordenador realizó dos gráficas o histogramas con fluorescencia verde (FL1) y roja (FL2). Los histogramas de fluorescencia representaron la fluorescencia relativa en una escala logarítmica. El citómetro se programó para analizar células fagocíticas, mostrando los mayores valores de SSC y FSC. La habilidad fagocítica se definió como el porcentaje de células con una o más bacterias ingeridas (células fluorescentes verdes) en la población de células fagocíticas mientras que la capacidad fagocítica fue la intensidad media de fluorescencia. El estudio cuantitativo de los resultados de la citometría de flujo se realizó utilizando la opción estadística de Lysis Software Package (Becton Dickinson).

2.6.4. Estallido respiratorio

El estallido respiratorio de los leucocitos de *L. aurata* se estudió mediante un método quimioluminiscente, tal como fue descrito por Bayne y Levy (1991). En resumen, en una placa de 96 pocillos de fondo plano se sembraron muestras de 10⁶ leucocitos in sRPMI, a los que se les añadieron 100 µl de HBSS con 1 µg ml⁻¹ de miristato acetato de phorbol (PMA, Sigma) y luminol 10⁻⁴ M (Sigma). La placa se puso en agitación y la luminiscencia fue leída inmediatamente en un lector de placas durante 1 hora a intervalos de 2 minutos. Se analizó la cinética de las reacciones y se calculó la pendiente máxima de cada curva. La luminiscencia de fondo se calculó utilizando soluciones que contenían luminol pero no PMA.

2.7 Análisis estadístico

Los se expresaron como media ± error estándar- Los parámetros inmunológicos y los datos de ácidos grasos individuales se analizaron estadísticamente mediante el test de la t de Student para determinar diferencias entre los grupos. La normalidad de los datos se comprobó previamente utilizando el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de las varianzas se verificó usando el test de Levene. Los datos con una distribución no normal se transformaron logarítmicamente antes de los análisis, y cuando no cumplían con los requisitos paramétricos, se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de

un test de comparación múltiple. Los porcentajes de ácidos grasos se transformaron mediante la función arcoseno ($x + 1$). Se llevaron a cabo análisis de componentes principales (PCA), SIMPER (similaridad de porcentajes) (Warwick et al. 1990; Clarke 1993) y test de permutaciones (PERMANOVA) (Clarke 1993; Anderson 2004) con 4999 permutaciones, para comprobar las diferencias significativas para el perfil completo de ácidos grasos entre grupos. El análisis de SIMPER se llevó a cabo usando el índice de disimilaridad de Bray-Curtis (Bray y Curtis 1957). Los análisis estadísticos se realizaron usando SPSS 19.0 y Primer (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research; v.6.1.13) y su paquete estadístico complementario PERMANOVA+ (v.1.0.3). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p \leq 0,05$. Las correlaciones entre cada ácido graso y los parámetros inmunológicos se representaron utilizando CIRCOS (Krzywinski et al. 2009).

3. Resultados

3.1 Perfil de ácidos grasos de las dietas

Se analizó el perfil de ácidos grasos de la dieta natural y del pienso comercial. La dieta natural mostró un mayor porcentaje de ARA, EPA y DHA que el pienso comercial, así como menores porcentajes de OA y LA. Por lo tanto, se considera a la dieta natural rica en ácidos grasos n-3 mientras que el pienso comercial es rico en ácidos grasos n-6 (Tabla 2).

3.2 Crecimiento

Los especímenes de mújol alimentados tanto con dieta natural como con pienso comercial no mostraron diferencias significativas entre sus tasas de crecimiento (Tabla 3).

Tabla 3. Crecimiento de los especímenes de mújol alimentados con la dieta natural o con el pienso comercial tras 8 semanas de experimentación. Los valores se expresan como media \pm E.S. (n = 9).

Experimental groups	Wi	Wf	SGR	CF	WG%
Natural diet	8.68 \pm 0.48	9.80 \pm 1.05	0.21 \pm 0.04	2.20 \pm 0.04	12.91 \pm 3.11
Commercial feed	8.58 \pm 0.71	9.69 \pm 0.84	0.21 \pm 0.07	1.84 \pm 0.09	12.88 \pm 2.41

Wi: peso inicial; Wf: peso final; SGR: tasa específica de crecimiento; CF: factor de condición; WG (%): porcentaje de ganancia de peso.

3.3 Los porcentajes de ácidos grasos del músculo reflejaron el cambio de dieta

Los porcentajes de ácidos grasos individuales de músculo reflejaron las respectivas composiciones de ácidos grasos de las dietas. El músculo de los peces que recibieron el pienso comercial mostraron diferencias significativas en ácidos grasos individuales en comparación con los especímenes del grupo dieta natural tan solo 2 semanas después del cambio de dieta, mientras que las diferencias fueron ligeramente mayores tras 8 semanas (Tabla 4). Los marcadores de consumo de pienso comercial (OA, LA y LNA) fueron mayores en los peces del grupo pienso comercial, y fueron asociados a menores

porcentajes de ARA, 20:3n-6 (ácido dihomo- γ -linoleico, DGLA) y DHA, mientras que EPA permaneció sin cambios. Por lo tanto, el porcentaje total de ácidos grasos n-6 fue significativamente mayor, con menores niveles de ácidos grasos n-3 en los peces que recibieron el pienso comercial, alterando el ratio n-3/n-6 (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentajes de ácidos grasos (media \pm E.S.) de músculo de mújol alimentado con dieta natural, y alimentado con pienso comercial tras 2 y 8 semanas. Los asteriscos marcan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el grupo que consumió dieta natural y el que consumió pienso comercial para cada tiempo de muestreo.

	Experimental time			
	2 weeks		8 weeks	
	Natural diet	Commercial feed	Natural diet	Commercial feed
14:0	5.28 \pm 0.20	4.85 \pm 0.19	5.63 \pm 0.56	4.84 \pm 0.13
15:0	0.37 \pm 0.02	0.24 \pm 0.01*	0.27 \pm 0.03	0.19 \pm 0.02*
16:0	26.56 \pm 0.62	23.23 \pm 0.25*	27.35 \pm 0.99	23.57 \pm 0.47*
18:0	3.72 \pm 0.23	2.78 \pm 0.10	3.55 \pm 0.68	2.82 \pm 0.09
20:0	0.31 \pm 0.01	0.27 \pm 0.01	0.28 \pm 0.04	0.27 \pm 0.01
22:0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Total saturated	36.25 \pm 0.63	31.37 \pm 0.41*	37.08 \pm 0.97	31.68 \pm 0.59*
16:1n-7	9.17 \pm 0.47	9.42 \pm 0.30	12.06 \pm 1.28	8.67 \pm 0.22*
18:1n-9	15.42 \pm 0.42	19.94 \pm 0.24*	17.85 \pm 0.61	22.77 \pm 0.45*
18:1n-7	3.45 \pm 0.10	3.26 \pm 0.04	3.38 \pm 0.09	3.23 \pm 0.07
20:1n-9	3.63 \pm 0.11	1.97 \pm 0.09*	3.09 \pm 0.17	1.33 \pm 0.11*
22:1n-9	0.38 \pm 0.01	0.25 \pm 0.00*	0.31 \pm 0.03	0.23 \pm 0.01
24:1n-9	0.46 \pm 0.02	0.31 \pm 0.01*	0.45 \pm 0.07	0.26 \pm 0.01*
Total monounsaturated	32.51 \pm 0.86	35.16 \pm 0.27	37.14 \pm 1.56	36.47 \pm 0.57
18:2n-6 (LA)	1.29 \pm 0.04	9.29 \pm 0.27*	1.31 \pm 0.18	12.81 \pm 0.36*
18:3n-6	0.06 \pm 0.04	0.16 \pm 0.03*	0.00 \pm 0.00	0.23 \pm 0.01*
20:2n-6	0.34 \pm 0.01	0.35 \pm 0.01	0.29 \pm 0.02	0.40 \pm 0.01*
20:3n-6	0.33 \pm 0.02	0.21 \pm 0.01*	0.27 \pm 0.03	0.03 \pm 0.02*
20:4n-6 (ARA)	2.12 \pm 0.13	1.20 \pm 0.06*	2.16 \pm 0.61	0.61 \pm 0.05*
22:2n-6	0.44 \pm 0.01	0.49 \pm 0.01	0.39 \pm 0.02	0.51 \pm 0.02*
22:4n-6	0.26 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	0.25 \pm 0.03	0.02 \pm 0.02*
Total n-6 PUFA	4.84 \pm 0.17	11.89 \pm 0.25*	4.67 \pm 0.88	14.61 \pm 0.39*
18:3n-3 (LNA)	0.48 \pm 0.02	1.54 \pm 0.04*	0.45 \pm 0.02	1.95 \pm 0.07*
18:4n-3	0.95 \pm 0.03	0.90 \pm 0.03	0.83 \pm 0.07	0.78 \pm 0.03
20:3n-3	0.00 \pm 0.00	0.10 \pm 0.03*	0.00 \pm 0.00	0.17 \pm 0.03*
20:5n-3 (EPA)	8.18 \pm 0.33	7.48 \pm 0.19	7.61 \pm 0.79	6.65 \pm 0.29
22:5n-3	1.99 \pm 0.09	1.77 \pm 0.06	1.63 \pm 0.11	1.50 \pm 0.07
22:6n-3 (DHA)	14.80 \pm 1.01	9.79 \pm 0.49*	10.59 \pm 0.71	6.17 \pm 0.46*
Total n-3 PUFA	26.40 \pm 1.17	21.59 \pm 0.67*	21.12 \pm 1.56	17.23 \pm 0.82*
Total PUFA	31.24 \pm 1.31	33.48 \pm 0.62	25.79 \pm 2.40	31.84 \pm 1.12*
n-3/n-6	5.45 \pm 0.15	1.83 \pm 0.08*	5.15 \pm 0.35	1.18 \pm 0.04*
EPA/DHA	0.58 \pm 0.05	0.77 \pm 0.02*	0.71 \pm 0.03	1.11 \pm 0.05*
Total lipids	2.24 \pm 0.25	3.42 \pm 0.24*	5.48 \pm 0.76	7.63 \pm 0.96

Los análisis de PERMANOVA también apuntaron a las diferencias existentes entre los grupos tanto a 2 como a 8 semanas. El análisis de SIMPER mostró que la contribución a la disimilaridad entre los grupos fue debida principalmente a LA, con una contribución del 26,22 % a las dos semanas y 22,79 % a las 8 semanas del cambio de dieta. Los cambios en los porcentajes de LA, DHA, LNA y OA fueron responsables en gran medida, de las disimilaridades entre grupos, contribuyendo globalmente en un porcentaje del 52,22 % a las 2 semanas, y junto con 16:0, en un 49,48 % a las 8 semanas.

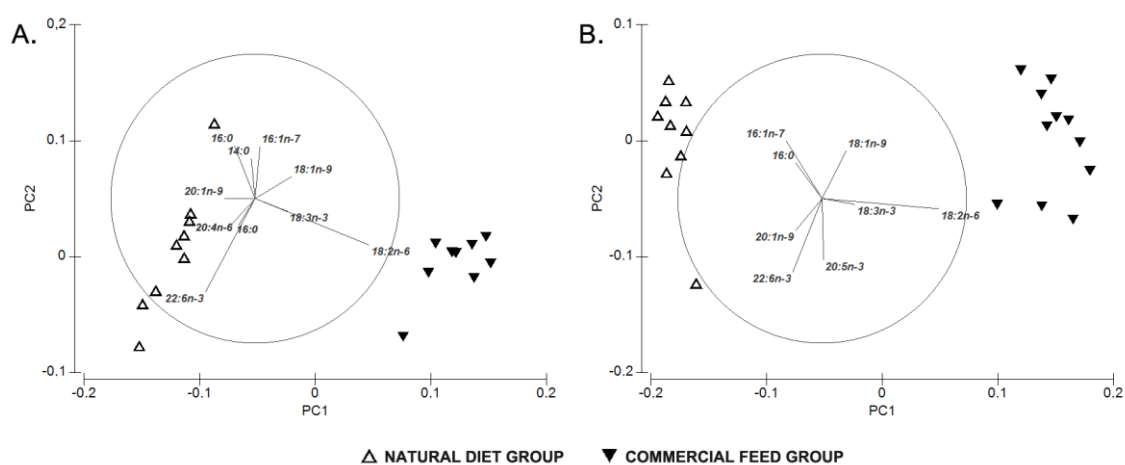


Figura 1. PCA de los ácidos grasos de músculo de los peces tras dos semanas (A) y tras 8 semanas de experimentación.

Los resultados de PCA para el perfil de ácidos grasos de músculo se muestran en la figura 1, con una varianza total explicada del 97,8 % a las 2 semanas (figura 1) y 98,3 % a las 8 semanas (figura 1B). La representación de las muestras en función de sus porcentajes de ácidos grasos tanto a 2 como a 8 semanas mostró dos grupos, uno compuesto por peces alimentados con la dieta natural, y otro compuesto por peces alimentados con el pienso comercial, caracterizados por altos niveles de LA y LNA en ambos tiempos de muestreo.

3.4 Parámetros de la inmunidad innata humoral

La actividad peroxidasa en suero de los especímenes de mújol mostró una respuesta diferente en función del tipo de dieta administrada (natural o comercial) (figura 2). La actividad peroxidasa en suero en peces de ambos grupos no mostró diferencias significativas tras dos semanas del cambio de dieta, pero fue significativamente mayor en peces alimentados con el pienso comercial tras 8 semanas (figura 2).

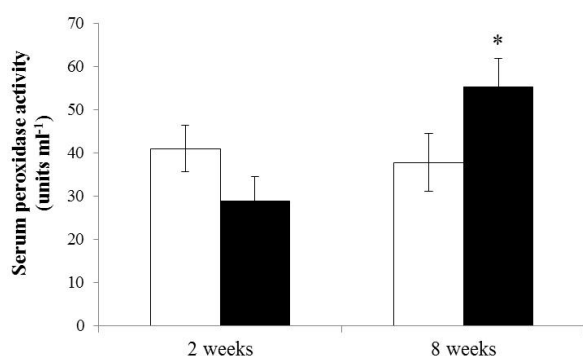
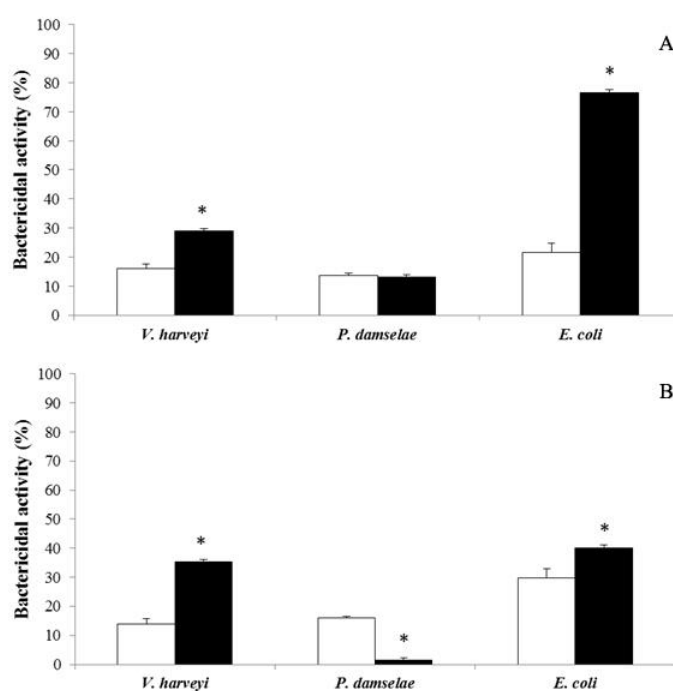


Figura 2. Actividad peroxidasa en suero (unidades ml suero⁻¹) de mújol alimentado con dieta natural (barras blancas) y con pienso comercial (barras negras) tras 2 y 8 semanas de experimentación. Las barras representan la media \pm E.S. (n = 6). Los asteriscos marcan diferencias significativas entre ambos grupos ($p \leq 0,05$).

Una de las funciones inmunes más prácticas es la habilidad para destruir directamente a las bacterias. Los peces alimentados con pienso comercial mostraron un aumento significativo tanto a 2 como a 8 semanas de la actividad bactericida en suero contra *V. harveyi* y *E. coli*, mientras que hubo una disminución significativa en esta actividad tras 8 semanas de consumo de pienso contra *P. damsela* en comparación con los valores obtenidos del suero de peces alimentados con la dieta natural (figura 3).

Figura 3. Actividad bactericida presente en las muestras de suero de los especímenes de mújol alimentados con dieta natural (barras blancas) o pienso comercial (barras negras) durante 2 (A) o 8 (B) semanas. Las barras representan la media \pm E.S. (n = 6). Los asteriscos marcan diferencias significativas entre ambos grupos ($p \leq 0,05$).



3.5 Parámetros de la inmunidad celular innata

Los parámetros de la inmunidad celular innata de juveniles de mujol se vieron afectados de diferentes formas. La actividad fagocítica (figura 4), el estallido respiratorio (figura 5) y la actividad peroxidasa (figura 6) no se vieron afectadas significativamente por el cambio a una dieta comercial. Sin embargo, tras 8 semanas de cambio de dieta, la capacidad fagocítica (figura 4B) se incrementó significativamente mientras que el estallido respiratorio (figura 5) disminuyó.

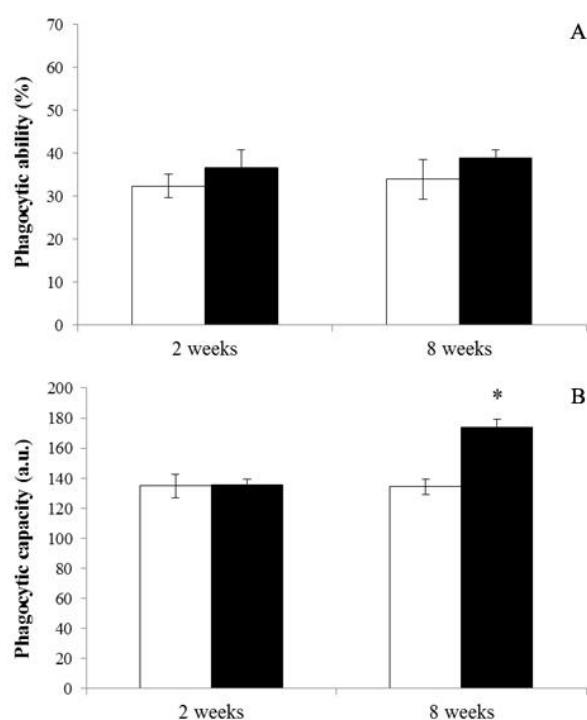
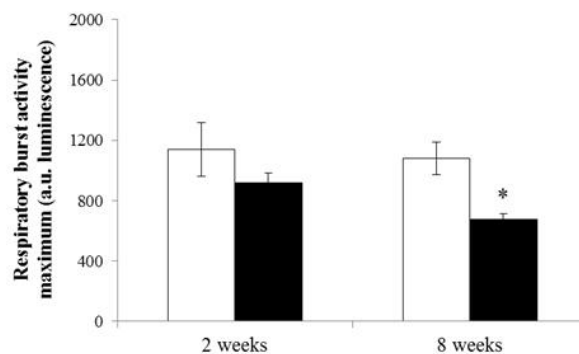


Figura 4. Habilidad fagocítica (%) (A) y capacidad fagocítica (a.u.) (B) de leucocitos de mujol alimentado con dieta natural (barras blancas) o pienso comercial (barras negras) durante 2 y 8 semanas. Las barras representan la media \pm E.S. (n = 6). Los asteriscos marcan diferencias significativas entre ambos grupos ($p \leq 0,05$).

Figura 5. Actividad del estallido respiratorio (curva min^{-1}) de leucocitos de riñón cefálico de mujol alimentado con dieta natural (barras blancas) o con pienso comercial (barras negras) tras 2 o 8 semanas de experimentación. Las barras representan la media \pm E.S. (n = 6). Los asteriscos marcan diferencias significativas entre ambos grupos ($p \leq 0,05$).



3.6 Correlaciones entre ácidos grasos y parámetros inmunológicos

Los factores de correlación entre los porcentajes de ácidos grasos y los parámetros inmunitarios humorales y celulares se encuentran disponibles en el material suplementario (Tabla S5). Los resultados mostraron que el estallido respiratorio de los leucocitos de riñón cefálico mostró el mayor número de correlaciones (tanto positivas como negativas) con ácidos grasos, seguido de la actividad peroxidasa y la capacidad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico de los peces alimentados con las dietas experimentales (figura 7).

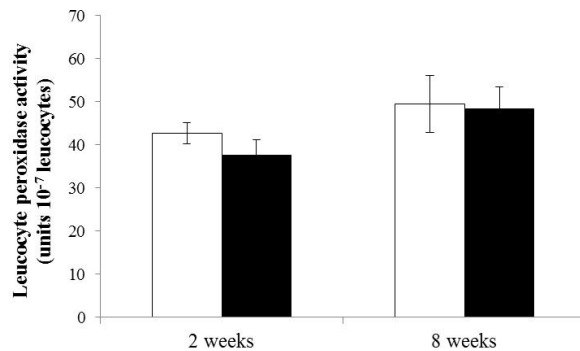


Figura 6. Actividad peroxidasa en leucocitos de riñón cefálico (unidades 10^{-7} leucocitos) de especímenes de mújoles alimentados con dieta natural (barras blancas) o con pienso comercial (barras negras) tras dos y 8 semanas de experimentación- Las barras representan la media \pm E.S. (n = 6).

4. Discusión

La mayoría de los peces cultivados marinos son especies piscívoras que requieren ácidos grasos de cadena larga de la serie n-3 en sus dietas, ya que poseen una capacidad limitada para sintetizarlos a partir de su precursor, LNA. *L. aurata* es un pez eurihalino de aguas cálidas, el cual se agrega alrededor de las estructuras de las jaulas de piscifactoría, aprovechando la disponibilidad de excedente de pienso (Fernandez-Jover et al. 2009). Al mismo tiempo, es bien sabido que los peces salvajes agregados pueden transmitir parásitos o enfermedades a otros peces salvajes agregados o incluso a los peces cultivados cuando se mueven de una granja a otra (Arechavala-Lopez et al. 2010; Dempster et al. 2009), y este hecho cobra importancia si el sistema inmune de los peces salvajes se ve alterado por el cambio de dieta. Como ya se ha visto por parte de otros autores, los tejidos de los peces reflejan la composición de ácidos grasos de la dieta (Farndale et al. 1999; Fountoulaki et al. 2009; Izquierdo-Gómez et al. 2014). Comparado con una dieta natural, el pienso comercial utilizado en este estudio presentó bajos niveles de ácidos grasos n-3, con la excepción de LNA, el cual fue relativamente abundante (2,99 %) mientras que los niveles de LA fueron de 18,74 %, y los de OA fueron 20,12 %. La mayoría de los trabajos que se encuentran en la bibliografía muestran cambios en el perfil de ácidos grasos en peces tras varios meses de consumo de una nueva dieta. Nosotros encontramos que dos semanas de alimentación con la nueva dieta fueron suficientes para mostrar cambios en el perfil de ácidos grasos de músculo. Los porcentajes de ácidos grasos individuales mostraron un perfil que reflejaba la dieta consumida, siendo la acumulación de LA, OA y LNA y la disminución de DHA en el grupo de pienso comercial, los principales responsables de las diferencias observadas. Estos cambios en los perfiles de ácidos grasos concuerdan con aquellos de otros autores que trabajaron con mújoles salvajes que se alimentaban del excedente de pienso de las jaulas (Fernandez-Jover et al. 2009) así como con mújoles y otras especies en condiciones de laboratorio, en donde se encontraron tendencias similares cuando se alimentaban con dietas ricas en aceites vegetales (Argyropoulou et al. 1992; Ashton et al. 1994; Mourente et al. 2007). Debido a las imitaciones del tamaño de las muestras, no pudimos analizar el perfil de ácidos grasos de los leucocitos, pero varios estudios han mostrado que diversos tejidos como el músculo tienden a reflejar la composición de ácidos grasos de la dieta (Farndale et al. 1999; Kiron et al. 2011). Los cambios en las membranas de las fibras musculares pueden ir acompañados de cambios en las

membranas de las células inmunes. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren una posible modificación de los ácidos grasos en varios tejidos, incluyendo riñón cefálico, el cual es el principal órgano hematopoyético en peces.

Los aspectos clínicos del consumo relativo de ácidos grasos n-3 y n-6 han sido muy estudiados en humanos (Calder 2007; Russo 2009) y ha quedado demostrado que el consumo de grandes cantidades de ácidos grasos n-3 desplaza a los ácidos grasos n-6 como el ARA en los fosfolípidos de las membranas celulares, disminuyendo la producción de eicosanoides derivados del ARA (Calder 2006), los cuales son biológicamente más potentes que los eicosanoides derivados del EPA (por ejemplo, leucotrieno B5 derivado del EPA, tiene de 10 a 100 veces menos efecto biológico que el leucotrieno B4, derivado del ARA) (Calder 2006; Kelley and Rudolph 2000), e inhibiendo el metabolismo del ARA. A pesar de algunas diferencias entre peces y mamíferos en relación a la composición de las membranas de las células inmunitarias (en las que EPA y ARA son los ácidos grasos predominantes respectivamente), los leucocitos de peces utilizan principalmente ARA como sustrato de eicosanoides de las series 2 y 4. Aunque cuando la ingesta de ácidos grasos n-3 en la dieta es suficientemente alta (como ocurre cuando se consume una dieta natural), estos compiten como sustrato de las ciclooxigenasas y las lipoxigenasas, dando lugar a la formación de eicosanoides de las series 3 y 5 (Rowley et al. 1995; Tocher 2003). Russo (2009) remarcó la mayor importancia de las cantidades relativas de ácidos grasos n-3 y n-6 que de las cantidades absolutas, considerándose una baja relación n-3/n-6 deletérea para la salud cardiovascular en humanos, mientras que lo mismo se puede decir de los peces (Martínez-Rubio et al. 2012). En nuestra investigación, los peces alimentados con la dieta comercial mostraron una disminución en la relación n-3/n-6 en ambos puntos de muestreo. Los cambios en el perfil de ácidos grasos fueron acompañados de modificaciones de algunos parámetros inmunitarios, los cuales deben ser indicativos de un efecto inmunomodulador debido a dicho cambio de dieta.

Primero evaluamos si la sustitución de la dieta natural por un pienso comercial afecta a los parámetros humorales. Se comprobó la actividad bactericida del suero frente a dos bacterias patogénicas (*V. harveyi* y *P. damsela*), y una bacteria no patogénica (*E. coli*). La actividad bactericida del suero del grupo de pienso comercial tuvo un menor efecto contra *P. damsela* a las 8 semanas de cambio de dieta, mientras que el mismo grupo

mostró una mayor actividad bactericida contra *V. harveyi* y *E. coli* tanto a dos como a 8 semanas. Nuestros resultados para *P. damsela* coinciden con los encontrados por [Montero et al. \(2010\)](#) en dorada, quien concluyó que la actividad bactericida contra este patógeno era más efectiva cuando los peces se alimentaban con una dieta baja en n-6. Estos resultados sugieren que el cambio de una dieta natural por un pienso comercial disminuyó las propiedades bactericidas del suero de mújol contra *P. damsela* tras 8 semanas. In contraste, otros autores ([Bell et al. 1996](#); [Montero et al. 2008](#); [Mourente et al. 2005](#)) no observaron diferencias en la actividad bactericida del plasma de peces, medida como actividad lisozima (la enzima bacteriolítica más estudiada en peces) ([Minagawa et al. 2001](#)) cuando los peces fueron alimentados con dietas ricas en aceites vegetales. Estos resultados aparentemente contradictorios apuntan a que se requieren más estudios que impliquen a un mayor número de organismos patógenos.

En relación a la inmunidad celular, de manera similar a los resultados de [Bell et al. \(1996\)](#) usando aceites de pescado y aceites vegetales en distintas concentraciones, la actividad fagocítica (medida como porcentaje de células fagocíticas) no mostró diferencias significativas entre grupos, aunque los leucocitos del grupo de pienso comercial mostraron un mayor capacidad fagocítica tras 8 semanas de cambio de dieta. [Wu et al. \(2003\)](#) encontraron que en general, la respuestas inmune, incluyendo fagocitosis, de juveniles de mero (*Epinephelus malabaricus*) se vieron potenciadas en gran medida debido al DHA, pero también al EPA. Esto resultó en mayores valores fagocíticos a bajas relaciones EPA/DHA en la dieta, lo cual no es consistente con nuestros resultados en juveniles de mújol, en los que la capacidad fagocítica fue significativamente mayor tras 8 semanas de consumo de pienso comercial, con una relación EPA/DHA mayor en este grupo que en los peces control. [Kiron et al. \(2011\)](#) comparó el uso de dietas ricas en aceite de cártamo (rico en n-6, predominantemente LA) o aceite de lino (rico en n-3, principalmente LNA) en trucha, no encontrando diferencias significativas en la actividad fagocítica. Del mismo modo, [Gjøen et al. \(2004\)](#) no observaron efectos en la actividad fagocítica en salmón (*Salmo salar*) debido a los ácidos grasos de la dieta, a pesar de que el porcentaje de ARA se incrementó en 3 veces en los leucocitos de riñón cefálico cuando los peces fueron alimentados con una dieta rica en aceite de soja. Estos datos pueden ser extrapolados a nuestros resultados en relación a la habilidad fagocítica (porcentaje de células fagocíticas), pero no a la capacidad fagocítica (el número relativo de levaduras ingeridas por células). A la luz de

los datos proporcionados por la bibliografía, se necesitan más estudios para poder alcanzar conclusiones firmes sobre los efectos de los ácidos grasos de la dieta en las células fagocíticas de peces.

Una vez que partículas extrañas, tales como bacterias, han sido fagocitadas por los macrófagos y granulocitos, son mantenidas en vacuolas en las que los fagocitos liberan toda una maquinaria química para destruir al patógeno. Una forma de hacerlo, probablemente la más importante y más ampliamente estudiada, es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante el proceso conocido como estallido respiratorio. En este estudio, los peces alimentados con el pienso comercial mostraron una disminución de la actividad del estallido respiratorio, que se volvió estadísticamente significativa tras 8 semanas de cambio de dieta. Estos resultados concuerdan con los de [Mourete et al. \(2005\)](#) en lubina. Ellos mostraron una disminución en la actividad del estallido respiratorio en peces alimentados con dietas ricas en aceites vegetales en comparación con peces alimentados con dietas ricas en aceites de pescado. A diferencia de nuestros resultados, [Montero et al. \(2003\)](#) no encontraron diferencias en la actividad del estallido respiratorio en juveniles de dorada que fueron alimentados con diversas dietas experimentales que contenían diferentes aceites vegetales o de pescado. De manera similar, otro estudio llevado a cabo en salmón mostró que el estallido respiratorio no se modificaba en función del tipo de lípidos (de origen marino o vegetal) de las dietas ([Bell et al. 1996](#)). Otro estudio en salmón alimentados con aceite de pescado o aceite de colza (rico en ácidos grasos n-6), utilizando un modelo de incubación del plasma *ex vivo* para estudiar la composición de ácidos grasos de las membranas de leucocitos de riñón cefálico, obtuvo como resultado que no había diferencias en la actividad del estallido respiratorio, incluso cuando los leucocitos mostraron la relación n-3/n-6 5 veces menor en comparación con controles ([Seierstad et al. 2009](#)). En cuanto a experimentos *in vitro*, comparando el diferente efecto de los ácidos grasos individuales en el estallido respiratorio, [Li et al. \(2013\)](#) sugirieron que el DHA tenía un efecto inhibitorio en la producción de anión superóxido en macrófagos aislados de corvina (*Larimichthys crocea*), mientras que la producción se potencio por EPA. Aunque la bibliografía es contradictoria, consideramos que un incremento en la capacidad de los macrófagos de *L. aurata* para fagocitar partículas no se ve acompañada por un consiguiente incremento en su capacidad para destruir las partículas fagocitadas mediante químicos tóxicos. De hecho, esta capacidad disminuyó significativamente a

las 8 semanas del cambio de dieta. La ingesta de alimentos ricos en ácidos grasos vegetales no produjo cambios en la actividad peroxidasa en leucocitos de riñón cefálico pero aumentó esa actividad en el suero de los peces que ingirieron el pienso comercial durante 8 semanas, lo que sugiere que esta enzima es secretada y no almacenada en los leucocitos. Estos resultados sugieren que puede haber una modulación a corto plazo de la actividad peroxidasa en suero en respuesta a cambios en la dieta. Estos datos pueden apuntar al papel potencial de los ácidos grasos en la actividad peroxidasa, y ello merece más análisis.

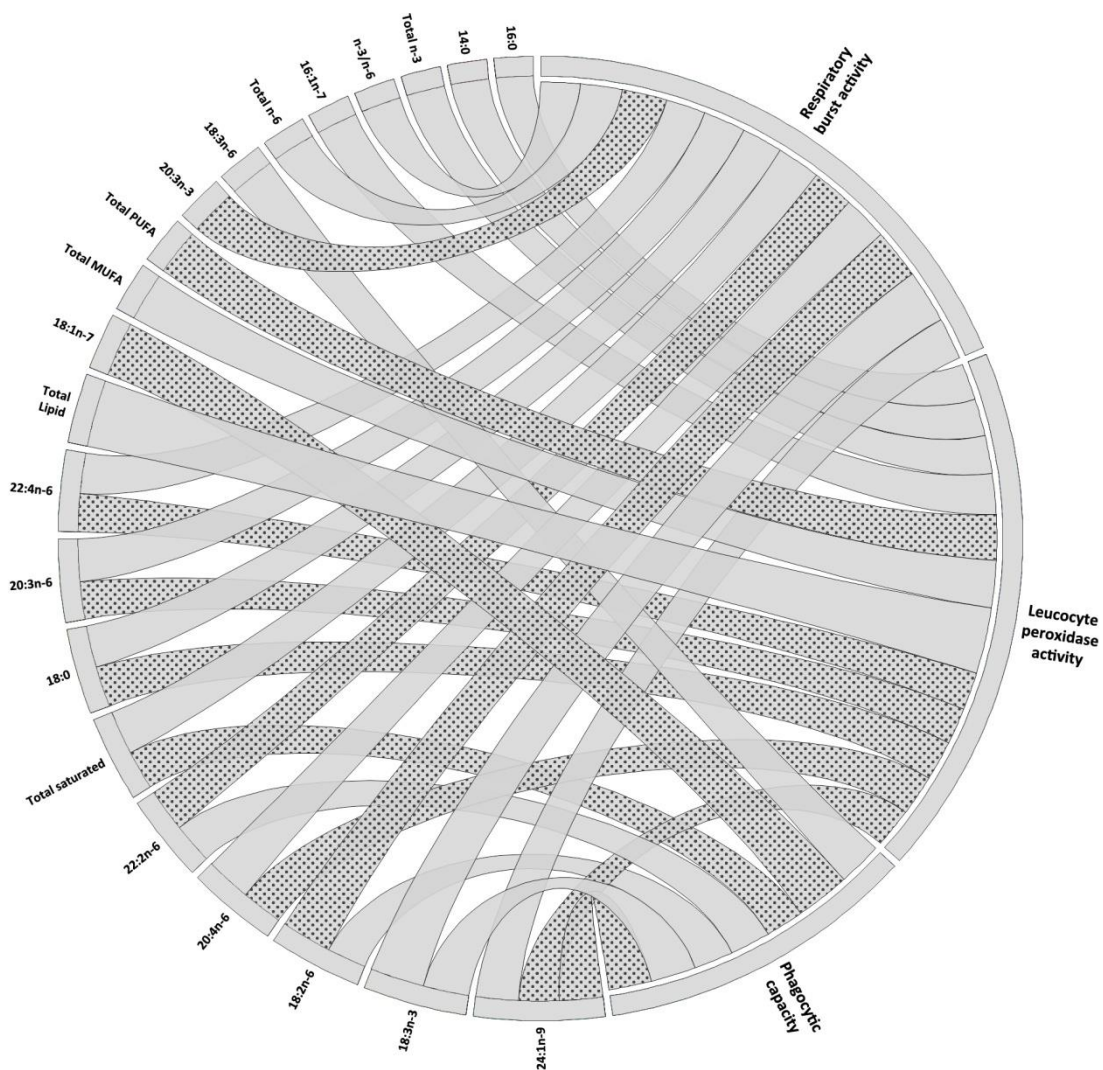


Figura 7. Diagrama circular representando las correlaciones entre ácidos grasos, incluyendo la relación n-3/n-6 y el valor de lípidos totales, y los parámetros inmunológicos. Solo se representan las correlaciones significativas ($p \leq 0,05$). Las bandas punteadas y las no punteadas representan correlaciones negativas y positivas respectivamente.

Nuestros resultados revelaron un alto número de correlaciones significativas de los ácidos grasos con los parámetros inmunológicos celulares en el siguiente orden descendiente: estallido respiratorio > actividad peroxidasa > capacidad fagocítica de leucocitos de riñón cefálico. Sin embargo, los valores de las correlaciones no son en general lo suficientemente altas como para identificar a un solo ácido graso como responsable de las diferencias en los parámetros inmunológicos celulares, o al menos en el periodo de tiempo establecido para este experimento tras el cambio de dieta.

5. Conclusión

En conclusión, las observaciones realizadas en el perfil de ácidos grasos del músculo tras dos semanas de cambio de dieta sugieren que los peces salvajes agregados a las jaulas podrían presentar modificaciones de su perfil de ácidos grasos natural y de su relación n-3/n-6 tras un corto periodo de consumo de pienso comercial. Algunos parámetros inmunológicos podrían cambiar en el caso de peces salvajes que llegan a las jaulas de piscifactoría y comienzan a alimentarse del excedente de pienso rico en aceites vegetales. Sin embargo, el alcance de esos cambios no puede ser considerado lo suficientemente grande como para deducir si la rápida asimilación de los ácidos grasos de la dieta puede ser perjudicial o no para el estado inmune de juveniles de mújol cuando se alimentan del excedente de pienso en periodos mayores de dos meses.

Agradecimientos

Queremos dar las gracias a David Verdiell Cubedo por su ayuda y experiencia en la captura de peces, y a Rubén Rabadán Ros y Amanda E. López Cánovas por su ayuda en el cuidado y mantenimiento de los peces. Este trabajo se ha llevado a cabo gracias a la financiación por parte del proyecto FATFISH CTM2009-14362-C02-02 y el proyecto AGL2011-30381-C03-01, del Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España, y el proyecto 04538/GERM/06 de la Fundación Séneca.

Chapter 4

Influencia de desechos de la acuicultura en diferentes niveles tróficos de peces agregados a piscifactorías.

1. Introducción

La industria de la acuicultura ha crecido en importancia durante las últimas décadas, alcanzando una producción de 66,6 millones de toneladas de peces en 2012 (FAO 2014). La ingesta de pescado se ha incrementado en todo el mundo debido al creciente conocimiento y concienciación general sobre las propiedades beneficiosas del consumo de peces y mariscos, principalmente debido a su alto contenido en ácidos grasos n-3 (Nichols et al. 2010; Simopoulos 1999; Tur et al. 2012). En este contexto, la acuicultura ha ocupado un lugar necesario a la hora de proveer pescado para consumo humano, y se ha llegado a la conclusión de que la acuicultura proporcionó la mitad de todo el pescado consumido en el mundo en 2014 (FAO). Sin embargo, la acuicultura no está exenta de críticas debido al impacto medioambiental, particularmente debido al aporte de grandes cantidades de materia orgánica en forma de excedente de pienso al medio marino, lo que podría alterar las propiedades fisicoquímicas de la columna de agua y de los sedimentos del fondo marino, incrementando el riesgo de anoxia debido a la actividad bacteriana y por lo tanto afectando a la fauna local (Fernandez-Gonzalez et al. 2013; La Rosa et al. 2001; Maldonado et al. 2005; Sanz-Lázaro and Marín 2011). Al mismo tiempo, las jaulas de las piscifactoría actúan como elementos de atracción de peces (FADs en sus siglas en inglés), atrayendo a un gran número de diferentes especies de peces salvajes y macroinvertebrados que aprovechan la protección que la estructura sumergida les proporciona, así como el aporte de grandes cantidades de excedente de pienso rico en energía y heces (Black et al. 2012; Dempster et al. 2009; Sanchez-Jerez et al. 2011; Sara et al. 2004). Los peces salvajes agregados pueden consumir hasta un 80 % de piensos en forma de pellets que caen de las jaulas (Vita et al. 2004), contribuyendo a minimizar el impacto medioambiental de la descarga de materia orgánica sobre el lecho marino (Felsing et al. 2005; Fernandez-Jover et al. 2008; Katz et al. 2002). Los piensos utilizados actualmente en acuicultura son ricos en aceites vegetales de diferente origen y composición lipídica, caracterizados en gran medida por la presencia de grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de cadena corta/media, como el ácido linoleico (18:2n-6; LA) y ácido α -linolénico (18:3n-3, LNA), además de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) como el ácido oleico (18:1n-9, OA) y ácidos grasos saturados (SFA) (Watanabe 2002). Los perfiles de ácidos grasos de los piensos comerciales, ricos en ácidos grasos n-6, son diferentes de los perfiles de ácidos grasos

de las dietas naturales de los peces salvajes, ricas en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie n-3. Es bien sabido que cambios en la relación n-3/n-6 pueden acarrear alteraciones en el sistema inmune, así como en la reproducción y el desarrollo larvario (Calder 2013; Izquierdo et al. 2001; Kiron 2012; Simopoulos 2002; Tocher 2003). La cantidad de ácidos grasos n-3, especialmente de ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) y de ácido docosahexaenoico (22:6n-3, DHA) en músculo, tiende a ser menor en peces cultivados cuando se comparan con individuos salvajes, lo que lleva a un mayor control de la composición de las dietas artificiales para los peces cultivados. Por ejemplo, esto se refleja en el uso de dietas finalizadoras ricas en ácidos grasos n-3 durante periodos determinados de tiempo pre-venta, para alcanzar así altos niveles de ácidos grasos n-3 en músculo y ofrecer al consumidor un producto lo más parecido posible a los peces salvajes en cuanto a composición de ácidos grasos (Henriques et al. 2014; Nichols et al. 2014). Desafortunadamente, este tipo de control no se puede ejercer sobre los peces salvajes agregados a jaulas, los cuales pueden ingerir piensos para pescado, ricos en ácidos grasos n-6 de origen vegetal durante un periodo indeterminado de tiempo, y portanto viéndose modificados en distinto grado los perfiles de ácidos grasos de diferentes tejidos. La calidad de los huevos está muy influenciada por la composición de lípidos de la dieta, que pueden ser los principales factores que determinan una reproducción exitosa y la supervivencia de la progenia en peces cultivados (Almansa et al. 1999; Izquierdo et al. 2001). DHA, EPA y ácido araquidónico (20:4n-6, ARA) son ácidos grasos esenciales para peces marinos (Sargent et al. 1999) ya que no los pueden sintetizar a partir de sus precursores, LNA y LA. Los ácidos grasos esenciales se requieren para la producción de vitelogenina, la cual se almacena en el oocito como la única fuente de nutrientes para el embrión (Alvarez-Lajonchere 2006). La acumulación de ácidos grasos de origen vegetal puede llegar a desplazar los niveles de ácidos grasos esenciales en tejidos como las gónadas, posiblemente afectando al desarrollo de los oocitos cuando los peces se alimentan del excedente de pienso sin control, y este hecho merece ser investigado. También está el problema añadido de que los peces salvajes agregados pueden ser capturados por pescadores cuando se desplazan de la zona de jaulas a otras áreas, siendo ofrecidos a los consumidores como peces salvajes, cuando en realidad poseerían perfiles de ácidos grasos más parecidos a los de peces cultivados. En este caso el consumidor compraría un producto que no se corresponde con las características nutricionales deseadas para un pez de origen salvaje.

El objetivo de este trabajo fue comprobar el posible efecto en diferentes tejidos (músculo, cerebro, hígado y gónadas) del consumo de pienso comercial en forma de excedente de pienso por parte de peces salvajes agregados a jaulas. Se capturaron cuatro especies de peces, de conocido comportamiento de agregación a las jaulas y con diferentes hábitos alimentarios, en las cercanías de las jaulas de una piscifactoría, y sus perfiles de ácidos grasos se compararon con peces control capturados en alta mar a gran distancia de la granja, y especímenes capturados a una distancia intermedia de la piscifactoría. También se llevó a cabo un examen histológico de las gónadas de una de las especies para comprobar si había diferencias entre grupos para el desarrollo oocitario.

2. Material y métodos

2.1 Características de las especies estudiadas

Debido a la dificultad de muestrear peces salvajes, tan solo 4 especies fueron capturadas en número suficiente en las diferentes distancias estudiadas en este trabajo. Las especies capturadas pertenecieron a diferentes nichos tróficos, y fueron salmonete de fango (*Mullus barbatus* Linnaeus 1758, predador zoobéntico), en cual habita ambientes bénticos, consumiendo principalmente poliquetos, decápodos y pequeños crustáceos (Machias and Iabropoulou 2002); alacha (*Sardinella aurita* Valenciennes 1847, zooplanctívoro), el cual habita el medio pelágico y depreda principalmente copépodos y cladóceros (Morote et al. 2008); jurela (*Caranx rhonchus* Geoffroy Saint-Hilaire 1817, mesodepredador), el cual también habita el medio pelágico y depreda sobre todo teleósteos, crustáceos, moluscos y anélidos (Sley et al. 2008); y golfar (*Pomatomus saltatrix* Linnaeus 1766, piscívoro), el cual representa el mayor nivel trófico de este estudio, depredando principalmente teleósteos, pero también poliquetos, crustáceos y gastrópodos (Harding and Mann 2001).

2.2 Diseño experimental

Los especímenes de *M. barbatus* se muestrearon entre Abril y Septiembre de 2011, y los especímenes de *S. aurita*, *C. rhonchus* y *P. saltatrix* se muestrearon de Septiembre a Diciembre de 2011. También se muestrearon dos tipos de pienso comercial, cada uno de ellos utilizado en diferentes momentos en la piscifactoría durante el tiempo de muestreo (el pienso A se suministró durante el periodo Abril-Septiembre, y el pienso B se suministró en el periodo Septiembre-Diciembre), así como una muestra de heces. En función del lugar de captura, las cuatro especies se separaron en tres grupos de distancia creciente a la piscifactoría: grupo A, compuesto por peces capturados en los alrededores de dos piscifactorías situadas en la Bahía de Santa Pola, Alicante (sureste de España); grupo B, compuesto por peces capturados mediante técnicas artesanales a una distancia mínima de 1,5 km de las piscifactorías; y grupo C, compuesto por peces capturados en alta mar mediante técnicas de arrastre a una distancia mínima de 5 km de las piscifactorías.

Tabla 1. Condición corporal y número de réplicas. Las diferencias significativas se muestran en negrita y cursiva. Los resultados se expresan como media \pm S.D.

	<i>S. aurita</i>	<i>P. saltatrix</i>	<i>C. rhonchus</i>	<i>M. barbatus</i>
Standard Length¹				
A	23.17 \pm 2.56 ab	44.64 \pm 5.75 a	28.44 \pm 1.18	15.82 \pm 1.55 a
B	21.14 \pm 1.70 b	33.88 \pm 11.11 b	27.38 \pm 5.54	14.67 \pm 1.51 a
C	23.31 \pm 1.53 a	29.83 \pm 4.97 b	23.67 \pm 0.82	13.12 \pm 1.66 b
Weight				
A	196.30 \pm 54.58 a	1.296.00 \pm 504.37 a	397.38 \pm 40.80	75.26 \pm 20.21 a
B	137.10 \pm 35.59 b	688.42 \pm 486.62 b	378.77 \pm 229.97	60.00 \pm 18.21 a
C	165.57 \pm 29.14 ab	419.22 \pm 284.46 b	209.05 \pm 18.28	45.32 \pm 21.36 b
HI²				
A	0.62 \pm 0.25	1.36 \pm 0.65	1.71 \pm 0.27 a	1.76 \pm 0.93
B	0.54 \pm 0.27	1.30 \pm 0.34	1.34 \pm 0.22 b	1.44 \pm 0.45
C	0.59 \pm 0.22	1.15 \pm 0.66	1.04 \pm 0.15 c	1.60 \pm 1.42
GI³				
A	0.81 \pm 0.41 a	0.76 \pm 0.73	0.70 \pm 0.35	0.97 \pm 0.67
B	0.73 \pm 0.29 ab	1.03 \pm 0.86	0.53 \pm 0.17	1.15 \pm 0.85
C	0.50 \pm 0.21 b	0.64 \pm 0.44	0.44 \pm 0.32	1.14 \pm 1.18
CF⁴				
A	1.56 \pm 0.18 a	1.40 \pm 0.15	1.72 \pm 0.07 a	1.86 \pm 0.14
B	1.44 \pm 0.29 ab	1.49 \pm 0.36	1.67 \pm 0.11 ab	1.85 \pm 0.12
C	1.30 \pm 0.10 b	1.45 \pm 0.09	1.58 \pm 0.10 b	1.90 \pm 0.22
Number of replicates				
A	10	8	8	12
B	9	19	13	19
C	14	9	12	17

1: Body length from the snout to the place where the main ray of the tail comes out of the body.

2: Ratio of fish liver weight to body weight.

3: Ratio of fish gonad weight to body weight.

4: Weight x body length⁻¹.

2.3 Toma de muestras

El número mínimo de replicas para cada tratamiento y especie fue de ocho. Todas las muestras se mantuvieron en hielo hasta su traslado al laboratorio. Se midió el peso total y la longitud de los peces, así como el peso del hígado y gónadas con el fin de obtener los índices hepatosomático y gonadosomático. Se obtuvieron muestras de músculo tomadas de la porción antero-dorsal, hígado y cerebro para análisis de ácidos grasos. También se obtuvieron muestras de gónadas, que se dividieron en dos porciones, una para análisis de ácidos grasos y otra para examen histológico. Se obtuvieron tres réplicas de cada tipo de pienso para análisis de ácidos grasos, mientras que solo un pool de heces pudo ser analizado debido a la dificultad implícita en la obtención de cantidades suficientes. Las muestras para la determinación de ácidos grasos se congelaron a -80 °C hasta su análisis.

2.4 Análisis de ácidos grasos

Los ácidos grasos se extrajeron de 0,3-1,0 g de tejido mediante su homogeneización en 20 ml de cloroformo/metanol (2:1 v:v) con un homogeneizador de tejidos Ultra Turrax (IKA ULTRA-TURRAX T 25 digital, IKA-WERKE). Los lípidos totales se obtuvieron de acuerdo al método de Folch et al. (1957) y las impurezas no lipídicas se eliminaron lavando con KCl al 0,88 % (p/v). El peso de los lípidos obtenidos se determinó gravimétricamente tras la evaporación del solvente y el desecado de la muestra durante toda la noche en vacío. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs) se obtuvieron mediante transesterificación ácida de los lípidos totales de acuerdo con el método descrito por Christie (2003), y las muestras fueron transesterificadas durante toda la noche en una mezcla de 2 ml de ácido sulfúrico al 1 % en metanol (más 1 ml de tolueno para disolver los lípidos neutros) a 50 °C. Los ésteres metílicos se extrajeron dos veces en 5 ml de iso-hexano/dietil éter (1:1 v/v) tras neutralizar con 2 ml de KHCO_3 al 2 %, se desecaron en atmósfera de nitrógeno y se disolvieron de nuevo en 0.1 ml de iso-hexano. Los ésteres metílicos se purificaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) utilizando iso-hexano : dietil éter : ácido acético (90:10:1 v/v/v). Los FAMEs se separaron y cuantificaron mediante cromatografía gas-líquido usando una columna capilar flexible de sílice SP^{TM} 2560 (100m de largo, diámetro interno de 0,25 mm y 0,20 mm de grosor; SUPELCO) in cromatógrafo Hewlett-Packard 5890. La temperatura del cromatógrafo se programó a 5 min a una temperatura inicial de 140 °C, un aumento a 3 °C/min hasta 230 °C, seguido de un aumento a 3 °C/min hasta 240 °C, manteniéndose esta temperatura durante 12 min. Como gas transportador se utilizó helio a una presión de 300 kPa, y los picos se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención con estándares apropiados de ésteres metílicos (Sigma). Las concentraciones individuales de ácidos grasos se expresaron como porcentajes del contenido total.

2.5 Histología de las gónadas

Se seleccionaron especímenes hembra de *M. barbatus* para el examen histológico de las gónadas, debido a la disponibilidad de individuos capturados al mismo tiempo (Abril) tanto en la zona de alrededor de las jaulas (grupo A) como a larga distancia de las jaulas mediante técnicas de arrastre (grupo C, control), con el fin de evitar diferencias en el estado de desarrollo de las gónadas debidas a la época del año. Las gónadas se procesaron histológicamente para la estimación de la oogénesis. Se fijaron muestras de

la parte anterior, central y posterior del ovario en 4 % (v/v) de tampón formaldehído durante 24 h. Tras ello, las muestras de tejido se lavaron en tampón fosfato y se mantuvieron en alcohol al 70 %. Las piezas fijadas se procesaron en un procesador de muestras automático (MYR, España), y se incluyeron en parafina. Para el estudio histológico y morfométrico, secciones seriadas desparafinadas (5 µm) se rehidrataron y se tiñeron con una tinción rutinaria de hematoxilina-eosina. Las muestras se analizaron en el “Servicio de Análisis de Imagen, Universidad de Murcia” utilizando el equipamiento adecuado para análisis estereológico.

Tabla 2. Porcentajes de ácidos grasos (media ± D.S.) de ambos tipos de piensos utilizados en las piscifactorías.

	Feed A	Feed B
14:0	5.51 ± 1.98	7.02 ± 0.12
15:0	0.33 ± 0.12	0.43 ± 0.00
16:0	14.24 ± 0.56	18.32 ± 0.18
18:0	2.98 ± 0.05	3.22 ± 0.02
20:0	0.29 ± 0.05	0.28 ± 0.00
22:0	0.22 ± 0.09	0.18 ± 0.01
Total saturated	23.57 ± 2.48	29.45 ± 0.29
16:1n-7	6.59 ± 0.59	8.23 ± 0.05
18:1n-9	19.13 ± 1.69	13.29 ± 0.04
18:1n-7	2.80 ± 0.67	2.94 ± 0.00
20:1n-9	4.31 ± 1.23	0.52 ± 0.01
22:1n-9	2.23 ± 0.05	0.12 ± 0.01
24:1n-9	0.45 ± 0.04	0.21 ± 0.01
Total monounsaturated	35.51 ± 0.64	25.30 ± 0.05
18:2n-6	9.32 ± 0.29	15.54 ± 0.04
18:3n-6	0.19 ± 0.11	0.29 ± 0.01
20:2n-6	0.56 ± 0.01	0.28 ± 0.00
20:3n-6	0.21 ± 0.01	0.12 ± 0.01
20:4n-6	0.84 ± 0.04	0.84 ± 0.01
22:2n-6	0.03 ± 0.02	0.00 ± 0.00
22:4n-6	0.05 ± 0.05	0.05 ± 0.04
Total n-6 PUFA	11.22 ± 0.31	17.12 ± 0.02
18:3n-3	0.27 ± 0.02	2.09 ± 0.10
18:4n-3	1.80 ± 0.04	1.90 ± 0.00
20:3n-3	0.50 ± 0.06	0.03 ± 0.05
20:5n-3	12.82 ± 0.74	13.40 ± 0.13
22:5n-3	1.89 ± 0.11	1.03 ± 0.01
22:6n-3	12.44 ± 0.91	9.68 ± 0.09
Total n-3 PUFA	29.71 ± 1.77	28.13 ± 0.30
Total PUFA	40.93 ± 2.07	45.25 ± 0.30
Total Lipid	18.66 ± 0.86	14.79 ± 0.67

2.6 Análisis estereológico

El análisis estereológico se llevo a cabo utilizando Visiopharm NewCAST Stereology software, un microscopio OlympusBX61, y una cámara digital Pixelink (1,9 Mpx). Para cada sección histológica se seleccionaron aleatoriamente 6 campos diferentes. El tamaño de los oocitos se determinó mediante la superposición de 2 retículas de puntos de distinto tamaño, contando el número de marcas en cada categoría (Oogonia, oocitos en fase nucleolar, oocitos en fase de transición, oocitos en fase perinucleolar, oocitos en fase de vitelogénesis temprana, oocitos en fase de vitelogénesis tardía y oocitos maduros). El volumen celular se determinó mediante el uso de nucleadores, marcando el centro del núcleo y estimando el área del oocito a partir de la intersección de seis líneas aleatorias con la membrana del oocito (Bucholtz et al. 2013).

2.7 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar. Los datos de los ácidos grasos individuales se analizaron estadísticamente mediante análisis de la varianza de doble vía (ANOVA) para determinar diferencias entre grupos. Se llevaron a cabo análisis de escalado multidimensional (MDS), SIMPER (similaridad de porcentajes) (Clarke, 1993; Anderson, 2004) y un test de permutaciones (PERMANOVA) (Clarke, 1993; Anderson, 2004) comprendiendo 4999 permutaciones, para comprobar diferencias en el perfil completo de ácidos grasos entre los grupos. Los análisis de SIMPER se llevaron a cabo usando el índice de disimilaridad de Bray-Curtis (Bray and Curtis, 1957). Los análisis estadísticos se realizaron usando SPSS 19.0 y Primer (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research; v.6.1.13) y su paquete estadístico complementario PERMANOVA+ (v.1.0.3). Como los datos de los ácidos grasos son porcentajes, se transformaron mediante la función arcoseno ($x + 1$), y todos los test estadísticos se llevaron a cabo con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

3. Resultados

3.1 Condición corporal

Todos los especímenes de los tres grupos fueron peces adultos, sin aparentes signos de enfermedad ni infestación por parásitos. Hubo algunas diferencias entre grupos para la talla y el peso, así como para los índices hepatosomático y gonadosomático (Tabla 1).

3.2 Perfil de ácidos grasos de los piensos y las heces

El perfil de ácidos grasos del pienso (Tabla 2) indicó un alto porcentaje de SFA y MUFA, que en conjunto supusieron el 55-59 % de ambos tipos de piensos. El contenido en PUFA representó el 40,93 % en el pienso A y 45,25 % en el pienso B, siendo OA el ácido graso de origen vegetal mayoritario en el pienso A (19,13 %) y 16:0 y LA en el pienso B (18,32 % y 15,54 % respectivamente), mientras que el contenido de LNA fue de 0,27 % y 2,09 % y el de DHA fue 12,44 % y 9,68 % en los piensos A y B respectivamente.

El análisis de las heces indicó un gran contenido de SFA (32,34 %) y MUFA (48,01 %) con contenido de OA del 28,71 % de los lípidos totales de la muestra, y un bajo contenido de PUFA (19,65 %, siendo LA el principal PUFA (9,71 %)). Se observaron bajos niveles de ARA (0,34 %), LNA (0,32 %), EPA (2,76 %) y DHA (3,36 %).

3.3 Perfil de ácidos grasos de los diferentes tejidos

Las diferencias significativas en los principales ácidos grasos individuales entre los tres grupos se muestran en las tablas 3, 4, 5 y 6 para *S. aurita*, *P. saltatrix*, *C. rhonchus* y *M. barbatus* respectivamente. En general, las diferencias significativas siguieron la misma tendencia en los cuatro tejidos estudiados en todas las especies: el grupo A mostró mayores porcentajes de OA, MUFA totales, LA, n-6 totales y LNA, y menores porcentajes de SFA totales, ARA, EPA, DHA, n-3 totales y en la relación n-3/n-6, en comparación con los grupos B y C, o con solo uno de ellos. Hubo algunas excepciones, como el EPA en cerebro de *C. rhonchus*, cuyo porcentaje fue mayor en peces del grupo A que del grupo C; MUFA totales en cerebro y gónadas de *M. barbatus*, que mostraron menores niveles en peces del grupo A; y ARA en cerebro, que mostró mayores niveles en dicho grupo.

PERMANOVA indicó diferencias significativas para el perfil completo de ácidos grasos, generalmente entre grupo A con grupo B, o grupo A con grupo C, siendo *M.*

barbatus la excepción, mostrando diferencias significativas para el perfil de ácidos grasos entre los tres grupos (Tabla 7). El análisis de SIMPER indicó que los ácidos grasos que más contribuyeron a las disimilaridades entre los grupos fueron OA, LA y DHA (Tabla 8). Las muestras en los gráficos de MDS se identifican por el incremento de la distancia a las piscifactorías (grupos A, B y C respectivamente) (Figura 1), en donde las muestras que mostraron un perfil de ácidos grasos similar aparecen representadas juntas.

3.4 Histología de la gónada

El análisis histológico y morfométrico de los ovarios de *M. barbatus* reveló la presencia de oocitos en diferentes estados de maduración, lo que indica que esta especie presenta un ovario asincrónico. Se observaron los típicos estadios de maduración de teleósteos: oogonias, oocitos en estado nucleolar, oocitos en perinucleolar, oocitos en estado de vitelogénesis temprana, y oocitos en estado de vitelogénesis tardía, así como oocitos en estado de transición entre el estado nucleolar y el perinucleolar (Figura 2). Los oocitos en estado de vitelogénesis tardía no se incluyeron en el análisis estadístico, ya que solo se encontraron de manera ocasional en peces del grupo A. El porcentaje de oocitos que habían comenzado la oogénesis (oocitos en vitelogénesis temprana) tendió a ser mayor, y los oocitos en fase perinuclear fueron significativamente menores, en gónadas de peces capturados alrededor de las piscifactorías (grupo A) en comparación con los peces control (grupo C) (Figura 3). No hubo diferencias en el volumen para casi todas las fases de desarrollo, con la excepción de los oocitos en estado de transición, los cuales presentaron un mayor volumen en el grupo C (Figura 3B).

Tabla 3. Porcentaje de ácidos grasos y lípidos totales, y relación n-3/n-6 de muestras de músculo, cerebro, hígado y gónada de *S. aurita* (medias \pm D.S.).

	Flesh			Brain			Liver			Gonad		
	Group A	Group B	Group C	Group A	Group B	Group C	Group A	Group B	Group C	Group A	Group B	Group C
SFA ¹	30.62 \pm 2.76 a	34.31 \pm 3.35 a	37.08 \pm 3.81 b	28.83 \pm 3.50	25.14 \pm 5.26	26.87 \pm 4.57	36.87 \pm 3.96 a	51.41 \pm 8.04 b	50.82 \pm 6.38 b	31.65 \pm 2.23 a	49.00 \pm 6.58 b	55.72 \pm 13.32 b
OA	22.08 \pm 1.53 a	8.84 \pm 7.23 b	4.34 \pm 1.47 b	34.97 \pm 7.32	35.07 \pm 3.98	35.34 \pm 2.33	27.11 \pm 5.66 a	11.43 \pm 6.40 b	9.51 \pm 4.23 b	21.25 \pm 2.05 a	10.51 \pm 2.55 b	9.20 \pm 1.58 b
MUFA ²	32.04 \pm 2.69 a	14.34 \pm 10.36 b	7.50 \pm 2.27 b	47.94 \pm 9.78	48.72 \pm 4.58	50.26 \pm 3.54	35.72 \pm 4.70 a	18.85 \pm 8.09 b	15.95 \pm 5.78 b	31.22 \pm 3.26 a	19.60 \pm 2.89 b	17.08 \pm 2.05 b
LA	16.58 \pm 5.06 a	5.52 \pm 6.29 b	1.86 \pm 0.60 b	2.79 \pm 1.96 a	1.16 \pm 1.36 ab	0.20 \pm 0.16 b	8.23 \pm 3.57 a	2.94 \pm 2.36 b	1.81 \pm 0.36 b	14.63 \pm 4.34 a	2.92 \pm 1.33 b	1.96 \pm 0.50 b
ARA	0.62 \pm 0.11 a	1.50 \pm 0.50 b	1.71 \pm 0.28 b	2.59 \pm 0.50	2.96 \pm 0.40	2.62 \pm 0.86	0.87 \pm 0.38 a	2.24 \pm 0.79 b	2.63 \pm 1.12 b	0.94 \pm 0.34 a	2.65 \pm 1.42 b	3.41 \pm 2.22 b
n-6 PUFA ³	18.93 \pm 5.22 a	8.36 \pm 5.98 b	4.56 \pm 0.42 b	6.33 \pm 2.01 a	5.36 \pm 1.60 ab	4.27 \pm 1.41 b	11.17 \pm 4.05 a	6.14 \pm 1.97 b	5.58 \pm 1.45 b	17.24 \pm 4.47 a	6.41 \pm 2.11 b	6.48 \pm 2.91 b
LNA	2.11 \pm 0.30 a	1.78 \pm 1.73 ab	0.92 \pm 0.92 b	0.41 \pm 0.44	1.07 \pm 1.91	0.69 \pm 1.68	0.92 \pm 0.47 a	0.58 \pm 0.31 ab	0.45 \pm 0.19 b	1.90 \pm 0.27 a	0.64 \pm 0.29 b	0.38 \pm 0.14 c
EPA	5.82 \pm 1.57	5.41 \pm 1.22	4.64 \pm 0.95	2.31 \pm 1.41	2.25 \pm 0.83	1.77 \pm 1.01	4.17 \pm 1.54 a	5.28 \pm 1.01 ab	6.04 \pm 1.82 b	6.53 \pm 1.47	6.15 \pm 2.45	4.69 \pm 2.49
DHA	8.58 \pm 2.62 a	34.49 \pm 16.40 b	44.35 \pm 5.51 b	13.35 \pm 4.69	16.91 \pm 3.92	15.70 \pm 5.41	9.44 \pm 2.98 a	16.50 \pm 4.12 b	19.73 \pm 5.96 b	9.50 \pm 3.65	16.80 \pm 7.00	14.42 \pm 8.96
n-3 PUFA ⁴	18.41 \pm 3.92 a	43.00 \pm 15.94 b	50.85 \pm 5.49 b	16.90 \pm 6.36	20.77 \pm 5.25	18.60 \pm 5.16	16.24 \pm 5.20 a	23.60 \pm 4.43 b	27.64 \pm 7.87 b	19.89 \pm 4.69	24.99 \pm 8.98	20.73 \pm 11.94
Total PUFA	37.34 \pm 4.96 a	51.36 \pm 11.06 b	55.41 \pm 5.30 b	23.23 \pm 7.90	26.13 \pm 6.01	22.87 \pm 5.56	27.41 \pm 8.02	29.74 \pm 4.09	33.23 \pm 9.01	37.13 \pm 5.16	31.39 \pm 8.47	27.20 \pm 14.28
n-3/n-6	1.09 \pm 0.58 a	8.03 \pm 5.04 b	11.30 \pm 2.13 b	2.70 \pm 0.52	4.06 \pm 1.18	4.40 \pm 1.48	1.60 \pm 0.74 a	4.12 \pm 1.20 b	5.03 \pm 0.93 b	1.25 \pm 0.48 a	4.31 \pm 2.03 b	3.11 \pm 1.41 b
Σ (LA; LNA)	18.69 \pm 5.31 a	7.30 \pm 6.52 b	2.78 \pm 0.68 b	3.20 \pm 2.11	2.22 \pm 2.35	1.16 \pm 1.96	9.15 \pm 4.00 a	3.51 \pm 2.61 b	2.26 \pm 0.47 b	16.53 \pm 4.57 a	3.56 \pm 1.31 b	2.35 \pm 0.54 b
TL	9.90 \pm 4.89 a	2.70 \pm 4.13 b	0.99 \pm 0.51 b	13.89 \pm 1.96	15.18 \pm 2.15	13.63 \pm 2.68	14.52 \pm 7.41 a	4.51 \pm 2.73 b	5.96 \pm 4.42 b	11.25 \pm 8.51 a	2.34 \pm 2.16 b	2.66 \pm 2.41 b

1: includes 14:0, 15:0, 16:0, 18:0, 20:0, and 22:0

2: includes 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7, 20:1n-9, 22:1n-9 and 24:1n-9

3: includes 18:2n-6, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-6, 22:2n-6 and 22:4n-6

4: includes 18:3n-3, 18:4n-3, 20:3n-3, 20:5n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3

Tabla 4. Porcentaje de ácidos grasos y lípidos totales, y relación n-3/n-6 de muestras de músculo, cerebro, hígado y gónada de *P. saltatrix* (medias ± D.S.).

	Flesh			Brain			Liver			Gonad		
	Group A	Group B	Group C	Group A	Group B	Group C	Group A	Group B	Group C	Group A	Group B	Group C
SFA ¹	31.58 ± 2.14 a	32.98 ± 2.68 a	36.34 ± 3.36 b	32.06 ± 2.39 a	35.12 ± 3.67 ab	36.41 ± 2.60 b	35.62 ± 4.03	38.81 ± 7.19	40.20 ± 5.63	35.81 ± 4.93	44.13 ± 10.90	42.26 ± 7.48
OA	19.27 ± 4.73	18.93 ± 8.41	19.29 ± 5.29	30.26 ± 3.77 a	27.67 ± 3.12 ab	25.69 ± 1.24 b	26.62 ± 4.48	24.43 ± 10.46	27.79 ± 5.08	18.12 ± 2.00	15.52 ± 3.81	15.22 ± 3.04
MUFA ²	27.77 ± 6.82	26.52 ± 10.80	27.59 ± 7.40	41.73 ± 4.29 a	37.48 ± 3.63 b	34.92 ± 0.70 b	38.25 ± 4.08	35.42 ± 12.50	40.13 ± 4.57	27.49 ± 2.83	24.49 ± 5.53	23.66 ± 4.65
LA	7.25 ± 5.30 a	3.29 ± 4.95 ab	0.83 ± 0.33 b	3.38 ± 3.30 a	1.52 ± 1.41 b	0.49 ± 0.35 b	6.01 ± 3.66 a	2.92 ± 4.00 ab	0.97 ± 0.52 b	6.01 ± 3.90 a	2.61 ± 2.53 ab	1.70 ± 0.74 b
ARA	2.46 ± 1.23	2.75 ± 0.91	3.04 ± 0.64	2.24 ± 0.46	2.47 ± 0.61	2.88 ± 0.65	1.73 ± 1.09	2.35 ± 1.72	2.47 ± 1.20	5.18 ± 2.56	5.53 ± 2.87	7.54 ± 3.19
n-6 PUFA ³	11.15 ± 4.82 a	7.21 ± 4.74 ab	5.00 ± 0.48 b	6.83 ± 3.52	4.77 ± 1.62	4.22 ± 0.78	9.81 ± 3.74 a	6.65 ± 4.43 ab	4.63 ± 2.42 b	12.70 ± 2.99	9.24 ± 3.87	10.58 ± 3.50
LNA	1.35 ± 0.54	0.72 ± 0.57	0.73 ± 0.61	0.38 ± 0.42	0.15 ± 0.18	0.13 ± 0.29	0.62 ± 0.33	0.35 ± 0.36	0.48 ± 0.54	0.65 ± 0.39 a	0.24 ± 0.26 b	0.36 ± 0.25 ab
EPA	4.74 ± 0.99	4.03 ± 0.91	4.09 ± 0.75	3.33 ± 0.36	3.01 ± 0.64	3.14 ± 0.65	2.35 ± 0.35	2.19 ± 0.84	2.04 ± 1.03	4.46 ± 0.96	3.54 ± 1.51	4.04 ± 1.43
DHA	20.98 ± 8.09	26.89 ± 12.00	24.17 ± 7.59	14.45 ± 2.58 a	18.40 ± 3.91 b	19.93 ± 2.12 b	10.95 ± 3.21	14.85 ± 8.29	10.51 ± 3.71	16.73 ± 5.96	16.81 ± 9.78	16.99 ± 6.99
n-3 PUFA ⁴	29.50 ± 8.06	33.29 ± 12.45	31.08 ± 7.77	19.39 ± 1.93 a	22.63 ± 4.15 b	24.44 ± 2.08 b	16.32 ± 2.74	19.13 ± 9.05	15.04 ± 5.74	24.00 ± 6.70	22.14 ± 11.47	23.49 ± 8.56
Total PUFA	40.65 ± 6.55	40.49 ± 12.05	36.08 ± 7.99	26.21 ± 3.95	27.40 ± 4.44	28.66 ± 2.45	26.13 ± 3.29	25.78 ± 10.87	19.67 ± 7.91	36.71 ± 6.34	31.38 ± 13.92	34.07 ± 11.22
n-3/n-6	3.39 ± 2.26	5.93 ± 3.16	6.21 ± 1.36	3.46 ± 1.49 a	5.25 ± 1.74 b	5.91 ± 0.87 b	2.09 ± 1.45	3.61 ± 1.94	3.50 ± 0.87	2.02 ± 0.92	2.26 ± 1.22	2.27 ± 0.69
Σ(LA; LNA)	8.60 ± 5.55 a	4.01 ± 5.38 b	1.56 ± 0.59 b	3.76 ± 3.70 a	1.67 ± 1.56 a	0.62 ± 0.64 b	6.63 ± 3.97 a	3.27 ± 4.33 ab	1.45 ± 1.04 b	6.66 ± 4.27 a	3.22 ± 2.94 b	2.11 ± 0.90 b
TL	1.97 ± 1.80	2.06 ± 2.71	1.69 ± 1.37	12.10 ± 3.80	9.54 ± 7.37	9.16 ± 1.28	10.19 ± 6.00	7.84 ± 4.67	6.61 ± 1.71	3.21 ± 0.73	2.84 ± 2.15	1.86 ± 0.41

1: includes 14:0, 15:0, 16:0, 18:0, 20:0, and 22:0

2: includes 16:1n-7, **18:1n-9**, 18:1n-7, 20:1n-9, 22:1n-9 and 24:1n-9

3: includes **18:2n-6**, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6, **20:4n-6**, 22:2n-6 and 22:4n-6

4: includes **18:3n-3**, 18:4n-3, 20:3n-3, **20:5n-3**, 22:5n-3 and **22:6n-3**

Tabla 5. Porcentaje de ácidos grasos y lípidos totales, y relación n-3/n-6 de muestras de músculo, cerebro, hígado y gónada de *C. rhonchus* (medias ± D.S.).

	Flesh			Brain			Liver			Gonad		
	Group A	Group B	Group C	Group A	Group B	Group C	Group A	Group B	Group C	Group A	Group B	Group C
SFA ¹	29.01 ± 2.12 a	35.84 ± 3.45 b	35.04 ± 2.78 b	28.11 ± 2.23 a	30.76 ± 2.35 ab	33.30 ± 4.63 b	32.18 ± 2.20 a	39.88 ± 4.71 b	43.73 ± 4.69 b	34.77 ± 4.67 a	43.45 ± 6.23 b	51.17 ± 9.97 b
OA	23.46 ± 1.27 a	16.00 ± 5.71 b	11.96 ± 2.19 b	30.40 ± 1.26	27.67 ± 1.32	28.93 ± 3.39	27.64 ± 2.60	26.57 ± 7.68	26.09 ± 6.62	22.69 ± 1.94 a	19.23 ± 3.48 b	15.71 ± 2.04 c
MUFA ²	35.03 ± 2.19 a	23.25 ± 7.91 b	19.55 ± 4.14 b	43.25 ± 2.33	40.03 ± 1.56	41.25 ± 4.48	39.99 ± 2.76	37.33 ± 9.27	37.71 ± 8.41	35.10 ± 3.10 a	29.13 ± 4.15 b	25.69 ± 3.33 b
LA	11.92 ± 2.51 a	2.38 ± 2.59 b	1.24 ± 0.24 b	3.41 ± 1.23 a	0.63 ± 0.31 b	0.55 ± 0.21 b	10.63 ± 2.36 a	2.33 ± 2.68 b	0.79 ± 0.46 b	10.27 ± 2.07 a	3.02 ± 2.94 b	1.61 ± 1.18 b
ARA	0.89 ± 0.32 a	2.46 ± 0.92 b	2.92 ± 0.67 b	2.24 ± 0.41 a	2.92 ± 0.44 b	2.46 ± 0.42 ab	0.80 ± 0.21 a	2.17 ± 1.20 b	1.96 ± 0.89 b	0.92 ± 0.27 a	2.93 ± 1.74 b	3.33 ± 2.14 b
n-6 PUFA ³	14.34 ± 2.35 a	5.91 ± 2.57 b	5.16 ± 0.67 b	6.60 ± 1.07 a	4.41 ± 0.44 b	3.77 ± 0.24 c	12.91 ± 2.51 a	5.65 ± 3.15 b	3.62 ± 1.49 b	12.51 ± 2.17 a	7.23 ± 3.30 b	6.11 ± 2.38 b
LNA	1.58 ± 0.33 a	0.43 ± 0.37 b	0.33 ± 0.14 b	0.13 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.12	1.20 ± 0.23 a	0.32 ± 0.28 b	0.09 ± 0.11 c	1.49 ± 0.41 a	0.53 ± 0.41 b	0.25 ± 0.14 b
EPA	5.84 ± 1.04 a	4.43 ± 1.11 b	6.21 ± 1.98 ab	3.71 ± 0.53 a	3.20 ± 0.60 ab	2.91 ± 0.49 b	4.16 ± 0.90	3.15 ± 1.25	2.93 ± 0.94	5.80 ± 2.74	4.35 ± 1.49	3.73 ± 1.45
DHA	11.29 ± 3.88 a	28.41 ± 10.28 b	31.54 ± 8.46 b	16.72 ± 1.75	20.23 ± 1.87	17.40 ± 3.41	7.03 ± 2.16 a	11.99 ± 5.52 b	10.37 ± 3.81 ab	7.90 ± 2.34 a	13.48 ± 3.45 b	11.66 ± 5.63 ab
n-3 PUFA ⁴	21.62 ± 3.13 a	35.00 ± 9.55 b	40.25 ± 6.46 b	22.03 ± 2.26	24.80 ± 1.93	21.69 ± 3.67	15.03 ± 2.67	17.14 ± 6.58	14.94 ± 5.00	17.62 ± 5.61	20.18 ± 3.98	17.03 ± 7.29
Total PUFA	35.95 ± 2.47	40.91 ± 9.82	45.41 ± 6.78	28.63 ± 2.51 ab	29.20 ± 2.18 a	25.46 ± 3.76 b	27.92 ± 4.06 a	22.79 ± 8.27 ab	18.56 ± 6.39 b	30.13 ± 6.79	27.42 ± 6.27	23.14 ± 9.11
n-3/n-6	1.59 ± 0.58 a	6.61 ± 2.19 b	7.85 ± 1.24 b	3.40 ± 0.59 a	5.66 ± 0.54 b	5.75 ± 0.91 b	1.19 ± 0.27 a	3.64 ± 1.63 b	4.26 ± 0.75 b	1.42 ± 0.45 a	3.25 ± 1.43 b	2.81 ± 1.12 b
Σ(LA; LNA)	13.50 ± 2.81 a	2.81 ± 2.93 b	1.57 ± 0.35 b	3.54 ± 1.31 a	0.63 ± 0.31 b	0.60 ± 0.31 b	11.83 ± 2.57 a	2.66 ± 2.93 b	0.88 ± 0.55 b	11.76 ± 2.42 a	3.55 ± 3.33 b	1.86 ± 1.28 b
TL	6.35 ± 3.43 a	2.26 ± 1.42 b	1.98 ± 1.61 b	12.85 ± 2.09	11.81 ± 1.39	11.00 ± 1.04	17.01 ± 3.55 a	9.52 ± 5.01 b	9.79 ± 4.67 b	11.68 ± 4.76 a	4.83 ± 3.18 b	2.88 ± 1.71 b

1: includes 14:0, 15:0, 16:0, 18:0, 20:0, and 22:0

2: includes 16:1n-7, **18:1n-9**, 18:1n-7, 20:1n-9, 22:1n-9 and 24:1n-9

3: includes **18:2n-6**, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6, **20:4n-6**, 22:2n-6 and 22:4n-6

4: includes **18:3n-3**, 18:4n-3, 20:3n-3, **20:5n-3**, 22:5n-3 and **22:6n-3**

Tabla 6. Porcentaje de ácidos grasos y lípidos totales, y relación n-3/n-6 de muestras de músculo, cerebro, hígado y gónada de *M. barbatus* (medias ± D.S.).

	Flesh			Brain			Liver			Gonad		
	Group A	Group B	Group C	Group A	Group B	Group C	Group A	Group B	Group C	Group A	Group B	Group C
SFA ¹	36,19 ± 2,52	36,10 ± 3,22	36,38 ± 2,70	32,27 ± 2,98	31,98 ± 3,94	34,98 ± 4,44	36,66 ± 2,37 a	37,27 ± 6,67 a	44,42 ± 8,88 b	34,17 ± 9,97	33,29 ± 5,51	41,31 ± 11,80
OA	17,12 ± 2,76 a	14,51 ± 4,13 a	8,99 ± 3,63 b	21,50 ± 2,18	24,22 ± 2,66	23,06 ± 4,43	23,53 ± 3,69	19,90 ± 6,03	17,34 ± 6,98	8,53 ± 1,64	8,73 ± 2,98	11,19 ± 4,48
MUFA ²	31,23 ± 4,23 a	29,95 ± 5,96 a	18,39 ± 6,84 b	32,69 ± 3,01 a	36,96 ± 2,74 b	34,34 ± 3,89 ab	42,02 ± 3,62 a	37,69 ± 8,70 a	29,60 ± 9,06 b	15,81 ± 3,25 a	19,87 ± 3,64 ab	21,27 ± 7,10 b
LA	4,71 ± 2,56 a	1,14 ± 0,36 b	0,96 ± 0,17 b	1,12 ± 0,63 a	0,31 ± 0,28 b	0,59 ± 0,33 a	2,89 ± 1,21 a	0,67 ± 0,31 b	0,64 ± 0,22 b	2,74 ± 0,83 a	0,78 ± 0,41 b	1,05 ± 0,39 b
ARA	4,04 ± 0,94 a	3,62 ± 1,97 a	6,52 ± 2,87 b	5,36 ± 0,86 a	4,25 ± 0,74 b	3,89 ± 0,74 b	2,56 ± 0,65	2,81 ± 1,77	3,71 ± 2,01	10,00 ± 2,24	6,88 ± 2,64	6,82 ± 4,29
n-6 PUFA ³	12,17 ± 2,86 a	6,76 ± 2,50 c	9,04 ± 2,93 b	7,57 ± 1,65 a	5,24 ± 0,90 b	5,65 ± 1,33 b	7,45 ± 1,94 a	4,46 ± 2,25 b	5,56 ± 2,56 ab	15,51 ± 3,30 a	9,67 ± 2,24 b	9,44 ± 4,59 b
LNA	0,86 ± 0,51 a	0,42 ± 0,24 a	0,24 ± 0,10 b	0,34 ± 0,76	0,04 ± 0,08	0,14 ± 0,26	0,35 ± 0,21 a	0,15 ± 0,13 b	0,11 ± 0,20 b	0,20 ± 0,16	0,28 ± 0,49	0,30 ± 0,49
EPA	7,89 ± 1,19 a	9,89 ± 1,86 b	11,57 ± 1,55 c	3,71 ± 0,95	4,48 ± 1,45	4,69 ± 1,61	5,10 ± 1,21	5,64 ± 2,06	6,13 ± 3,74	9,76 ± 1,90	10,38 ± 1,90	8,49 ± 4,82
DHA	9,00 ± 4,21 a	14,40 ± 3,85 b	21,76 ± 6,57 c	22,20 ± 3,68	20,15 ± 3,20	18,76 ± 6,46	6,53 ± 1,90	13,23 ± 8,47	12,19 ± 7,35	21,33 ± 4,22	24,26 ± 7,74	16,83 ± 9,01
n-3 PUFA ⁴	20,42 ± 5,06 a	27,19 ± 4,95 b	36,19 ± 7,40 c	27,48 ± 3,32	25,83 ± 4,07	25,03 ± 6,23	13,87 ± 3,25	20,57 ± 10,84	20,42 ± 11,66	34,52 ± 5,39	37,13 ± 8,84	27,98 ± 14,06
Total PUFA	32,59 ± 5,51 a	33,95 ± 5,41 a	45,23 ± 8,46 b	35,05 ± 4,35	31,07 ± 4,66	30,68 ± 5,54	21,32 ± 4,19	25,04 ± 12,23	25,98 ± 13,36	50,02 ± 8,06	46,80 ± 8,63	37,42 ± 16,52
n-3/n-6	1,78 ± 0,70 a	4,50 ± 1,63 b	4,43 ± 1,78 b	3,75 ± 0,70 a	4,99 ± 0,75 b	4,81 ± 2,05 ab	1,94 ± 0,49 a	4,91 ± 1,91 b	3,75 ± 1,95 b	2,28 ± 0,39 a	4,03 ± 1,19 b	3,16 ± 1,75 ab
Σ(LA; LNA)	5,57 ± 2,78 a	1,56 ± 0,41 b	1,20 ± 0,23 c	1,46 ± 0,86 a	0,34 ± 0,33 b	0,74 ± 0,56 ab	3,24 ± 1,41 a	0,82 ± 0,42 b	0,75 ± 0,35 b	2,94 ± 0,93 a	1,06 ± 0,69 b	1,35 ± 0,83 b
TL	4,13 ± 2,41 a	3,44 ± 1,91 a	0,92 ± 0,59 b	10,00 ± 0,93	10,06 ± 1,59	9,24 ± 1,39	11,80 ± 2,72 a	7,79 ± 3,46 b	6,02 ± 3,45 b	2,24 ± 1,79	2,89 ± 1,67	4,74 ± 3,91

1: includes 14:0, 15:0, 16:0, 18:0, 20:0, and 22:0

2: includes 16:1n-7, **18:1n-9**, 18:1n-7, 20:1n-9, 22:1n-9 and 24:1n-9

3: includes **18:2n-6**, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6, **20:4n-6**, 22:2n-6 and 22:4n-6

4: includes **18:3n-3**, 18:4n-3, 20:3n-3, **20:5n-3**, 22:5n-3 and **22:6n-3**

Tabla 7. Resultados de PERMANOVA para cada especie y para los cuatro tejidos estudiados. Los valores de p significativos se muestran en *negrita y cursiva*.

	Source	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	A - B	A - C	B - C	
<i>S. aurita</i>	Flesh	Fatty acid profile	2	3638.9	1819.4	26.41	0.0002	0.0002	0.0002	0.054
		Res	30	2066.8	68.893					
		Total	32	5705.7						
	Brain	Fatty acid profile	2	659.6	329.8	17.622	0.0872	-	-	-
		Res	30	5614.6	187.15					
		Total	32	6274.2						
	Liver	Fatty acid profile	2	2139.6	1069.8	14.395	0.0002	0.0004	0.0002	0.4822
		Res	27	2006.6	74.318					
		Total	29	4146.2						
	Gonad	Fatty acid profile	2	2866.3	1433.1	18.809	0.0002	0.0002	0.0002	0.1306
		Res	28	2133.5	76.196					
		Total	30	4999.7						
<i>P. saltatrix</i>	Flesh	Fatty acid profile	2	382.53	191.27	18.369	0.09	-	-	-
		Res	32	3332	104.12					
		Total	34	3714.5						
	Brain	Fatty acid profile	2	278.77	139.39	3.125	0.0122	0.0636	0.015	0.1128
		Res	31	1382.7	44.603					
		Total	33	1661.5						
	Liver	Fatty acid profile	2	352.18	176.09	19.112	0.084	-	-	-
		Res	33	3040.4	92.134					
		Total	35	3392.6						
	Gonad	Fatty acid profile	2	447.27	223.63	20.433	0.0582	-	-	-
		Res	33	3611.8	109.45					
		Total	35	4059						
<i>C. rhonchus</i>	Flesh	Fatty acid profile	2	1638.6	819.31	15.575	0.0002	0.0002	0.0002	0.4288
		Res	23	1209.9	52.604					
		Total	25	2848.5						
	Brain	Fatty acid profile	2	276.61	138.31	36.121	0.0002	0.0006	0.0044	0.1158
		Res	25	957.25	38.29					
		Total	27	1233.9						
	Liver	Fatty acid profile	2	1172.1	586.07	10.183	0.0002	0.0002	0.0002	0.2414
		Res	27	1553.9	57.553					
		Total	29	2726.1						
	Gonad	Fatty acid profile	2	890.31	445.16	48.574	0.0022	0.0002	0.0292	0.0676
		Res	34	3115.9	91.645					
		Total	36	4006.3						
<i>M. barbatus</i>	Flesh	Fatty acid profile	2	1565.2	782.6	16.581	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
		Res	42	1982.4	47.2					
		Total	44	3547.6						
	Brain	Fatty acid profile	2	404.14	202.07	35.278	0.0268	0.0032	0.003	0.0342
		Res	45	2577.6	57.28					
		Total	47	2981.8						
	Liver	Fatty acid profile	2	1016.5	508.23	54.061	0.0002	0.004	0.0002	0.0114
		Res	40	3760.4	94.01					
		Total	42	4776.9						
	Gonad	Fatty acid profile	2	1068.1	534.06	43.085	0.0006	0.0002	0.0068	0.0166
		Res	36	4462.4	123.96					
		Total	38	5530.5						

Tabla 8. Similaridad de porcentajes (SIMPER), mostrando los tres ácidos grasos que mas contribuyeron a las disimilaridades encontradas mediante PERMANOVA. También se muestran el porcentaje acumulado (Cum.%) y la disimilaridad media (Av. Dis.).

<i>S. aurita</i>						<i>C. ronchus</i>						
	A - B		A - C		B - C		A - B		A - C		B - C	
<i>Flesh</i>	22:6n-3	22.69	22:6n-3	22.00	-	22:6n-3	16.61	22:6n-3	18.78	-	-	
	18:2n-6	15.24	18:2n-6	15.21	-	18:2n-6	15.90	18:2n-6	17.57	-	-	
	18:1n-9	14.56	18:1n-9	14.43	-	18:1n-9	7.68	18:1n-9	11.31	-	-	
	Cum.%	52.49	Cum.%	51.64	-	Cum.%	40.18	Cum.%	47.66	-	-	
	Av. Dis.	19.62	Av. Dis.	25.73	-	Av. Dis.	17.93	Av. Dis.	18.16	-	-	
<i>Brain</i>	-	-	-	-	-	18:2n-6	16.32	18:2n-6	16.88	-	-	
	-	-	-	-	-	18:1n-9	15.77	18:1n-9	15.45	-	-	
	-	-	-	-	-	22:6n-3	6.64	16:0	6.78	-	-	
	-	-	-	-	-	Cum.%	38.73	Cum.%	39.11	-	-	
	-	-	-	-	-	Av. Dis.	10.14	Av. Dis.	10.56	-	-	
<i>Liver</i>	18:1n-9	15.33	18:1n-9	15.97	-	18:2n-6	18.22	18:2n-6	19.95	-	-	
	18:2n-6	9.10	22:6n-3	10.10	-	22:6n-3	8.55	16:0	8.89	-	-	
	22:6n-3	8.08	18:2n-6	9.93	-	18:1n-9	6.85	18:3n-3	7.30	-	-	
	Cum.%	32.51	Cum.%	36.00	-	Cum.%	33.62	Cum.%	36.14	-	-	
	Av. Dis.	19.69	Av. Dis.	21.11	-	Av. Dis.	14.95	Av. Dis.	17.25	-	-	
<i>Gonad</i>	18:2n-6	15.52	18:2n-6	14.03	-	18:2n-6	15.51	18:2n-6	14.18	-	-	
	18:1n-9	10.55	18:1n-9	9.61	-	22:6n-3	8.62	22:6n-3	9.41	-	-	
	22:6n-3	9.03	16:0	8.68	-	18:0	7.67	16:0	7.54	-	-	
	Cum.%	35.10	Cum.%	32.32	-	Cum.%	31.79	Cum.%	31.13	-	-	
	Av. Dis.	19.00	Av. Dis.	23.97	-	Av. Dis.	14.31	Av. Dis.	13.92	-	-	
<i>P. saltatrix</i>						<i>M. barbatus</i>						
	A - B		A - C		B - C		A - B		A - C		B - C	
<i>Flesh</i>	-	-	-	-	-	22:6n-3	15.41	18:2n-6	12.53	22:6n-3	11.92	
	-	-	-	-	-	18:1n-9	10.64	22:6n-3	12.14	18:2n-6	11.13	
	-	-	-	-	-	18:2n-6	9.42	18:1n-9	6.95	16:1n-7	10.99	
	-	-	-	-	-	Cum.%	35.47	Cum.%	31.63	Cum.%	34.04	
<i>Brain</i>	-	-	18:2n-6	13.39	22:6n-3	10.22	22:6n-3	10.53	18:2n-6	8.82	22:6n-3	10.22
	-	-	22:6n-3	9.75	-	-	14:0	6.53	22:6n-3	7.29	18:1n-9	6.67
	-	-	14:0	9.13	-	-	15:0	6.19	14:0	6.64	14:0	6.64
	-	-	Cum.%	32.26	-	-	Cum.%	23.25	Cum.%	22.75	Cum.%	23.53
	-	-	Av. Dis.	10.96	-	-	Av. Dis.	11.34	Av. Dis.	10.16	Av. Dis.	10.90
<i>Liver</i>	-	-	-	-	-	22:6n-3	10.22	22:6n-3	13.45	22:6n-3	12.73	
	-	-	-	-	-	16:1n-7	9.85	18:2n-6	9.48	18:1n-9	9.51	
	-	-	-	-	-	18:1n-9	9.28	18:1n-9	8.29	16:1n-7	9.16	
	-	-	-	-	-	Cum.%	29.36	Cum.%	31.22	Cum.%	31.40	
	-	-	-	-	-	Av. Dis.	15.92	Av. Dis.	12.74	Av. Dis.	14.95	
<i>Gonad</i>	-	-	-	-	-	22:6n-3	9.77	22:6n-3	8.33	22:6n-3	12.84	
	-	-	-	-	-	20:4n-6	7.79	18:2n-6	7.29	20:4n-6	7.37	
	-	-	-	-	-	20:5n-3	6.88	16:1n-7	7.06	20:5n-3	7.30	
	-	-	-	-	-	Cum.%	24.44	Cum.%	22.68	Cum.%	27.51	
	-	-	-	-	-	Av. Dis.	17.08	Av. Dis.	15.47	Av. Dis.	16.76	

4. Discusión

Este trabajo demuestra, utilizando ácidos grasos como marcadores de consumo de excedente de pienso, que los peces salvajes asociados a jaulas presentan un perfil de ácidos grasos alterado en diversos tejidos, y que este efecto se atenúa conforme aumenta la distancia a las granjas. Las instalaciones de acuicultura atraen y concentran grandes cantidades de peces salvajes procedentes de zonas contiguas (Dempster et al. 2009), siendo el principal factor atrayente la disponibilidad de alimento rico en energía en forma de pellets perdidos de las jaulas que directamente alimentan a los peces agregados (Fernandez-Jover et al. 2008; Tuya et al. 2006). Los depredadores también se ven atraídos por las piscifactorías, en donde algunas especies modifican sus hábitos alimentarios, consumiendo los pellets que escapan de las jaulas, mientras que otras especies se ven atraídas por la gran densidad de presas potenciales en la zona, como es el caso de *P. saltatrix* (Fernandez-Jover et al. 2008; Sanchez-Jerez et al. 2008). Los niveles de materia orgánica particulada también se incrementan en los alrededores de las jaulas (Sara et al. 2004), siendo utilizada como recurso trófico por parte de especies planctívoras como *S. aurita* (Sanchez-Jerez et al. 2011) así como por algunas especies de macroinvertebrados (Gonzalez-Silvera et al. 2015).

El aporte de materia orgánica al medio marino por parte de las piscifactorías se debe principalmente al excedente de pienso y heces. Investigaciones previas han mostrado que no solo los pellets, sino que también las heces pueden ser usadas como recurso trófico por parte de macroinvertebrados (Madin et al. 2009; Gonzalez-Silvera et al. 2015) y peces (Johansson et al. 1998), por lo que incluso con la falta de réplicas, los datos del único pool de heces obtenido se utilizaron en este trabajo junto con los datos de los piensos para realizar los gráficos de MDS. MUFA fueron el principal componente de los lípidos totales de las heces (48,01 %) mientras que los niveles de PUFA fueron bajos (19,65 %). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Van Biesen and Parrish (2005), debiéndose la alta proporción de MUFA a la baja digestibilidad de estos por parte de los peces.

Las especies benthicas (*M. barbatus*) y pelágicas (*S. aurita* y *C. rhonchus*) respondieron a la influencia de las jaulas de manera similar en términos de porcentajes de ácidos grasos individuales. El músculo y el hígado son los que más reflejaron el perfil lipídico de las dietas,

generalmente siendo el incremento de OA y LA, y la disminución de DHA, los principales responsables de las diferencias encontradas entre el grupo A con los grupos B y C. OA y LA fueron los ácidos grasos más abundantes en los piensos y heces, y también fueron señalados por SIMPER como los ácidos grasos que ejercían más influencia sobre las diferencias observadas. Por lo tanto, son buenos candidatos como marcadores del consumo de restos de la acuicultura en la zona estudiada, especialmente LA, el cual fue el único ácido graso cuyos niveles fueron siempre significativamente mayores en el grupo A respecto a los peces capturados a mayores distancias, en los cuatro tejidos estudiados de las cuatro especies. Estos resultados sobre la idoneidad de los ácidos grasos mencionados confirman los encontrados previamente por otros autores en músculo de especies de peces salvajes asociados a granjas (Fernandez-Jover et al. 2011). La mayoría de las diferencias significativas se encontraron entre los peces capturados alrededor de las jaulas y los peces capturados por arrastre a gran distancia de las jaulas, los cuales se supone que han tenido contacto limitado o ninguno con instalaciones de acuicultura. Con pocas excepciones, los porcentajes de ácidos grasos, de peces capturados a distancias intermedias y a larga distancia, fueron similares, por lo que ambos pueden actuar como controles, pero siendo los peces del grupo C los que presentan el perfil de ácidos grasos menos alterado.

Hay varios estudios que, de manera similar a nuestros resultados, remarcan las diferencias encontradas en los ácidos grasos de músculo e hígado entre peces salvajes y cultivados. Alasalvar et al. (2002) y Fuentes et al. (2010) informaron de diferencias en los ácidos grasos de músculo entre lubina (*Dicentrarchus labrax*) salvaje y cultivada, estos últimos mostrando mayores niveles de OA y LA y menores niveles de ARA, EPA y DHA. Arechavala-Lopez et al. (2011) encontraron diferencias en el perfil de ácidos grasos del músculo de boga (*Boops boops*) agregada a jaulas y ejemplares capturados por pescadores con trasmallo en comparación con individuos capturados por arrastre a larga distancia. Los especímenes de boga capturados por trasmallo presentaron un perfil de ácidos grasos similar al de bogas asociadas a las jaulas, y ambos grupos mostraron la presencia de pellets en el contenido estomacal, mientras que las bogas capturadas por arrastre a mayores distancias de las piscifactorías presentaron restos tróficos naturales en su contenido estomacal. Los cambios en los ácidos grasos siguieron la misma tendencia que en nuestros resultados, encontrando en bogas capturadas alrededor de las jaulas, altos niveles de LA, LNA y OA y bajos niveles de

ARA y DHA, aunque los niveles de EPA fueron mayores en las bogas capturadas cerca de las jaulas que en las de a media distancia. Ramirez et al. (2013) obtuvo resultados similares en boga capturada dentro de un radio de 3 km de una piscifactoría. Fernandez-Jover et al. (2007) encontró que jureles (*Trachurus mediterraneus*) salvajes permanecían agregados alrededor de las jaulas a lo largo de todo el año, y su músculo mostró un perfil de ácidos grasos distinto del de individuos capturados en zonas control. En los especímenes agregados se encontraron altos porcentajes de LA, LNA y OA, y bajos porcentajes de ARA y DHA, en comparación con sus homólogos salvajes. Se han encontrado resultados similares en otras especies de peces marinos, como en dorada (*Sparus aurata*) (Grigorakis et al. 2002), mújoles (*Liza aurata*) agregados y oblada (*Oblada melanura*) (Fernandez-Jover et al. 2009), y también en bacalao Atlántico (*Gadus morhua*) y en carbonero (*Pollachius virens*) (Fernandez-Jover et al. 2011), sobre el cual se informó de diferencias en sabor del filete (Skog et al. 2003). Algunos estudios han informado de resultados opuestos, como el trabajo de Rueda et al. (2001), quienes encontraron mayores niveles de LA,

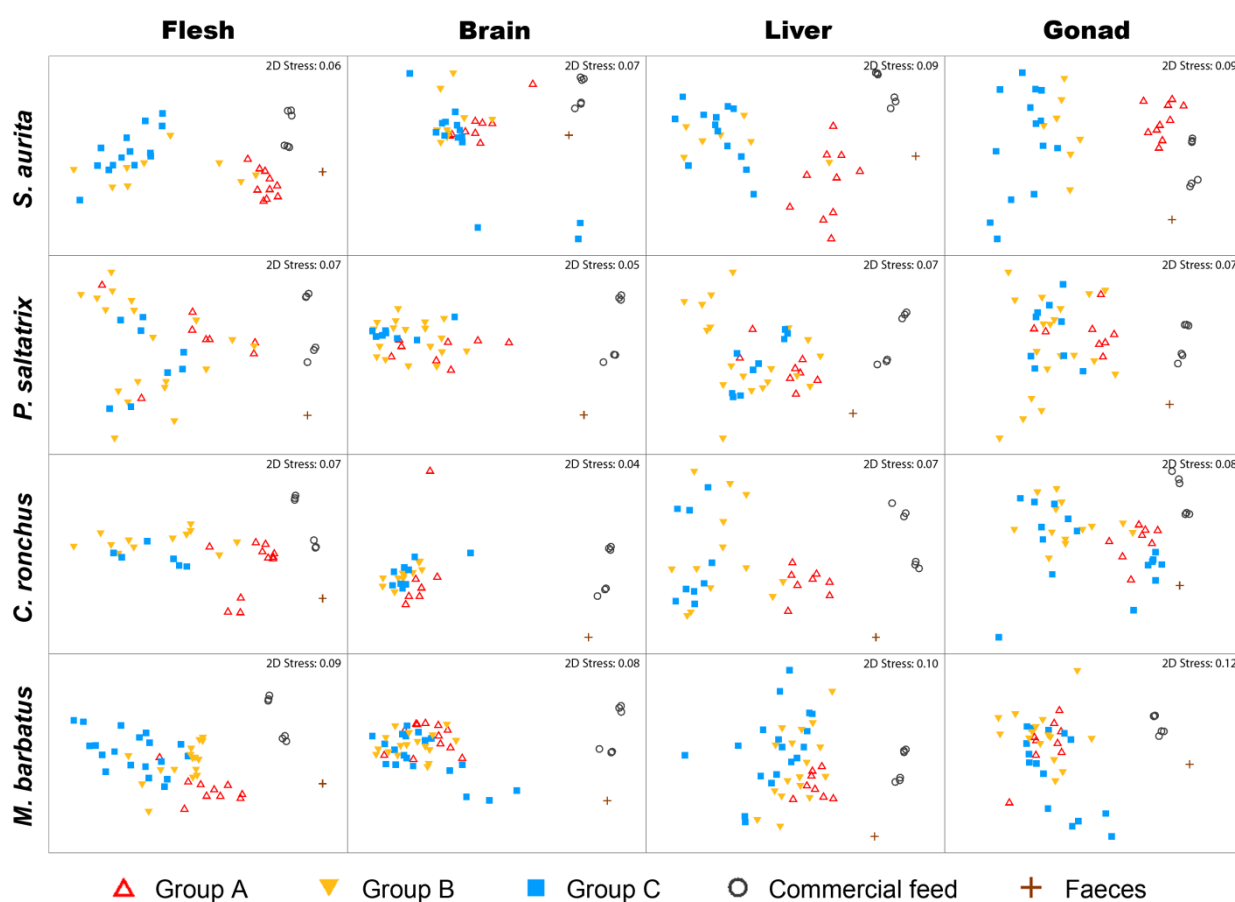


Figura 1. Gráficos de MDS. Incluyen los datos de los porcentajes de ácidos grasos de cada uno de los tejidos estudiados para las cuatro especies capturadas. También se incluyen los datos de ambos tipos de pienso y las

heces, con el fin de comprobar la influencia de los desechos de la acuicultura sobre los perfiles de ácidos grasos de los peces salvajes.

EPA y DHA en el músculo de sargo picudo (*Diplodus puntazzo*) cultivado, en comparación con el músculo de especímenes salvajes; y el trabajo de Mnari et al. (2007), quienes también encontraron altos valores de DHA y EPA en doradas cultivadas respecto a las salvajes. En cualquier caso, los niveles de LA en los dos últimos estudios mencionados fueron mayores en los peces cultivados.

Independientemente de su hábitat y sus patrones de alimentación, las cuatro especies estudiadas mostraron diferencias en sus perfiles de ácidos grasos, siendo más similar a los piensos y heces en peces capturados cerca de las jaulas, como se puede observar en las gráficas de MDS. Es de especial interés el caso del depredador *P. saltatrix*, del cual se ha informado que se alimenta de las especies agregadas a las jaulas, e incluso de los peces cultivados (Arechavala-Lopez et al. 2014; Sanchez-Jerez et al. 2008) en vez de consumir pellets. Esta especie se convierte en un buen ejemplo de transferencia de ácidos grasos a través de diferentes niveles tróficos. Las presas potenciales, como puede ser *S. aurita*, se agregan alrededor de las jaulas y consumen el excedente de pienso, y por lo tanto presentan un perfil de ácidos grasos modificado con una gran inclusión de LA. *P. saltatrix* depreda a estos peces salvajes en las proximidades de las jaulas, y el LA es asimilado y acumulado en músculo, hígado cerebro y gónadas, estas últimas mostrando además mayores niveles de LNA en comparación con los controles. El cerebro es un tejido resistente a los cambios, el cual presenta un perfil de ácidos grasos muy conservado debido al transporte selectivo a través de la barrera hematoencefálica, y a la síntesis de determinados ácidos grasos necesarios para su correcto funcionamiento. Sorprendentemente, y a diferencia de las otras tres especies estudiadas, el cerebro de *P. saltatrix* fue el tejido más alterado en cuanto a los porcentajes de ácidos grasos individuales, mostrando acumulación de OA además de LA, y disminución de DHA y presentando una relación n-3/n-6 menor en este tejido comparado con los individuos del grupo C. A la vista de los resultados, el cerebro presenta un distinto grado de respuesta al aporte de ácidos grasos vegetales en las diferentes especies estudiadas, aunque la tendencia general es la de presentar cambios menor magnitud que en los otros órganos estudiados.

Como ya ha sido comentado anteriormente, los ácidos grasos individuales en los cuatro tejidos estudiados de *M. barbatus* mostraron diferencias entre los tres grupos estudiados. Este

hecho implica que los especímenes del grupo B deben haber estado alimentándose cerca de las jaulas, o podrían haber estado agregados a jaulas en el pasado. Asumimos que el perfil de ácidos grasos menos influenciado por el consumo de piensos comerciales está representado por los peces del grupo C, y por lo tanto futuros estudios que impliquen el análisis de perfiles naturales de ácidos grasos deben tener cuidado si utilizan como controles solo peces capturados a una distancia media de las granjas, ya que estos podrían estar influenciados por los aportes de las granjas al medio debido a visitas previas a las piscifactorías, por lo que no representarían un buen ejemplo de peces control.

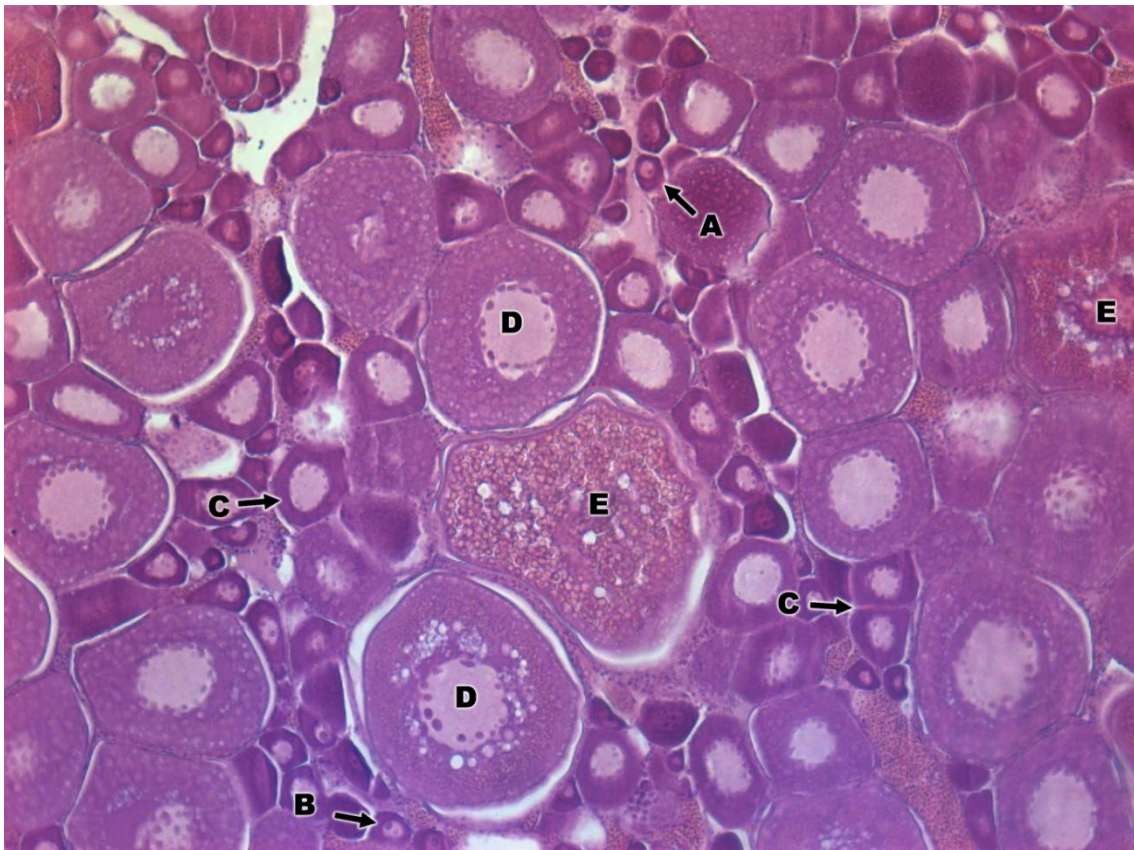


Figura 2. Fotografía tomada al microscopio óptico de una sección de ovario de *M. barbatus*, en el que se muestran diferentes estadios de desarrollo de los oocitos.

- A- Oocito en fase nucleolar.
- B- Oocito en fase de transición.
- C- Oocitos en fase perinucleolar.
- D- Oocitos en fase de vitelogénesis temprana.
- E- Oocitos en fase de vitelogénesis tardía.

Debido a la composición de los piensos, los peces salvajes agregados a piscifactorías suelen mostrar un mayor contenido en grasa y mayores valores del índice hepatosomático que los controles (Dempster et al. 2009; Arechavala-Lopez et al. 2011), que, junto con la disminución de la relación n-3/n-6, representan un importante cambio fisiológico. No obstante, se ha demostrado que incrementos en el contenido de grasa y en el factor de condición resultan en un incremento de la fecundidad y en el éxito de la eclosión, aunque la calidad de los huevos y la tasa de supervivencia de las larvas podría

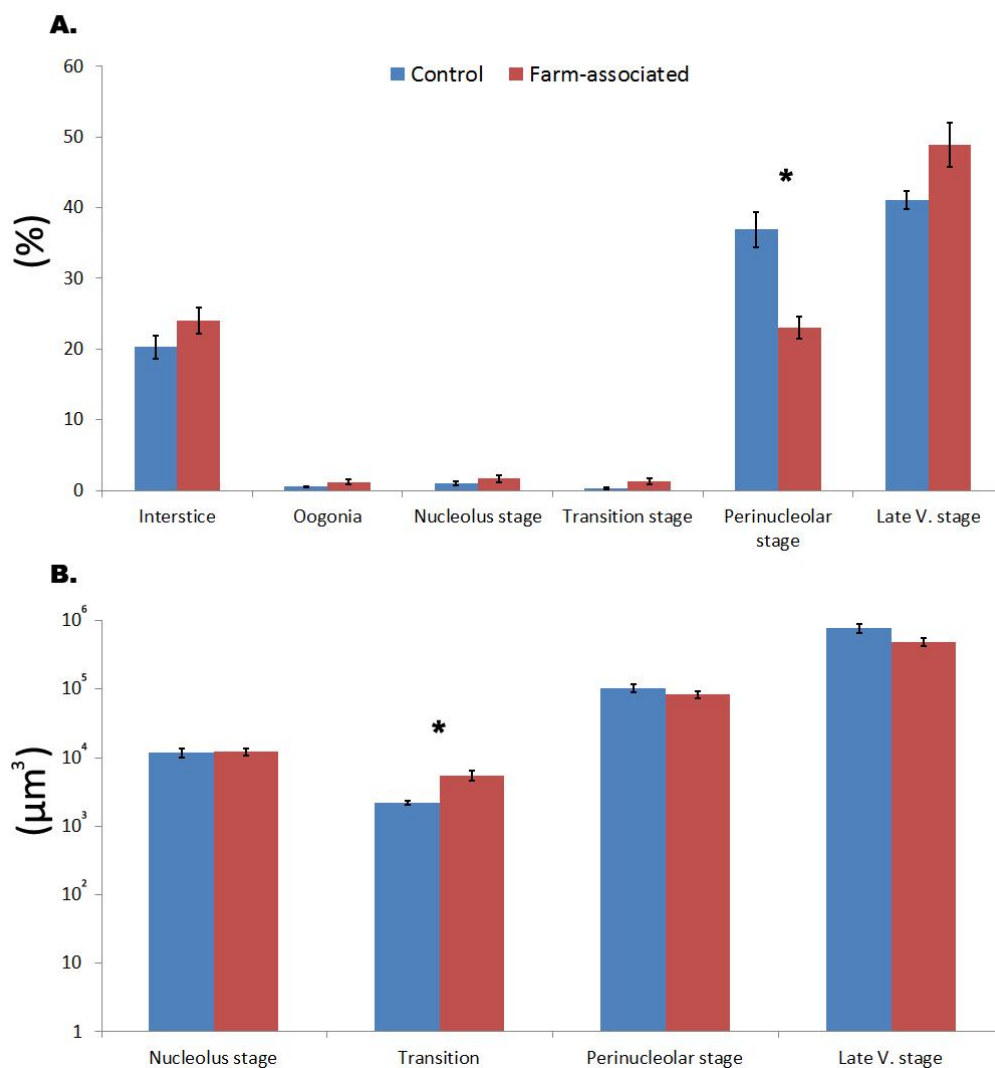


Figura 3. Proporciones (A) y volúmenes (B) de los distintos estadios de desarrollo de los oocitos en *M. barbatus*. Los volúmenes se representan en escala logarítmica.

verse afectada por los bajos niveles de DHA, y de ácidos grasos n-3 en general, proporcionados por las dietas artificiales (Adams 1999; Almansa et al. 1999; Fernández-

Palacios et al. 1995; Izquierdo et al. 2001). Durante la vitelogénesis, los peces necesitan alimentos ricos en grasas y proteínas con el objetivo de producir vitelogenina, la cual se almacena en los oocitos en forma de vitelo. La cantidad y calidad del vitelo son factores clave para una reproducción exitosa, ya que el vitelo representa la única fuente de alimento para el embrión y los primeros estadíos larvarios (Alvarez-Lajonchere 2006). Hauville et al. (2015) sugirió que, a pesar de los altos niveles de grasa encontrados en róbalo común (*Centropomus undecimalis*), los niveles de colesterol y de ARA fueron más bajos que en sus homólogos salvajes, lo que podría tener un efecto negativo en el éxito de la reproducción y en la gametogénesis, ya que se ha demostrado que ARA representa un papel importante en la maduración de la gónada (Pérez et al. 2007). Sin embargo, Cejas et al. (2003) informaron de que no hubo diferencias en los lípidos totales de gónadas entre sargo común (*Diplodus sargus*) salvajes y cultivados, y a diferencia de nuestros resultados en *M. barbatus*, pero de manera similar a las otras tres especies estudiadas, los peces cultivados presentaron menores niveles de ARA en las gónadas que los peces salvajes.

Las diferencias entre el grupo A y C en el perfil de ácidos grasos de las gonadas de *M. barbatus* se debieron principalmente a la acumulación de LA y a una disminución de DHA y de la relación n-3/n-6 en los peces agregados a jaulas. Estos cambios tuvieron pequeños efectos en la maduración de las gónadas, encontrándose en menor número los oocitos en fase perinuclear, y los oocitos en fase de vitelogénesis temprana en mayor número, en las gónadas del grupo A en comparación con las gónadas del grupo C. por lo tanto, es de esperar que *M. barbatus* asociado a piscifactorías e ingiriendo desechos de la acuicultura, tengan un desarrollo más rápido de la oogénesis, ya que además algunos oocitos en fase de vitelogénesis tardía fueron encontrados únicamente en muestras del grupo A, y debe estar causado por la mayor ingesta de grasa en la dieta. Con la excepción de los oocitos en fase de transición, los cuales mostraron un menor volumen en los peces asociados a jaulas, el volumen celular de los diferentes estadíos de desarrollo fue el mismo para ambos grupos, lo que es indicativo de una ausencia de diferencias en la cantidad de vitelogenina acumulada. En cualquier caso, no se encontraron diferencias en los lípidos totales de las gónadas, en el índice gonadosomático y en el factor de condición de esta especie, y el examen histológico no arrojó luz sobre la posible presencia de efectos negativos derivados del cambio de dieta.

5. Conclusión

Diferentes especies de peces agregados a piscifactorías, con diferentes hábitos alimentarios, mostraron alteraciones de sus perfiles de ácidos grasos en diferente grado en los cuatro tejidos estudiados, mostrando las especies pelágicas los perfiles más modificados en músculo e hígado. Existe una transferencia de ácidos grasos de origen vegetal, principalmente de LA, desde los piensos a los peces salvajes agregados, y de estos a los depredadores de alrededor de las jaulas. Estos efectos se atenúan a una distancia mayor de 1,5 km de las granjas, y desaparece totalmente en peces capturados a larga distancia (mínimo 5 km de las granjas). Recomendamos el uso de peces capturados lo más lejos posible de las piscifactorías para aquellos estudios que requieran la obtención de perfiles de ácidos grasos naturales como controles, con el fin de evitar una posible influencia de la acuicultura.

La transferencia de ácidos grasos a las gonadas debe ser un proceso muy regulado en *M. barbatus*, ya que solo se encontraron unas pocas diferencias en los peces asociados a jaulas en comparación con los controles. El cambio del consumo de una dieta natural al consumo de desechos de la acuicultura resultó en la acumulación de LA en las gónadas de *M. barbatus*, junto con la disminución de DHA y de la relación n-3/n-6, y una ligera aceleración de los estadios finales de desarrollo de los oocitos, sin un efecto aparente en el volumen celular. Se puede concluir que no se encontraron efectos adversos en el desarrollo oocitario en especímenes salvajes de *M. barbatus* agregados a piscifactorías.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación del proyecto FATFISH CTM2009-14362-C02-02 del Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España.

Chapter 5

Mediterranean fouling communities assimilate the organic matter derived from coastal fish farms as a new trophic resource.

1. Introduction

Anthropogenic perturbations in coastal marine ecosystems include the physical modification of habitats, the introduction of nutrients and pollutants, and alterations to populations of wild species as a result of fishing and other processes (Dempster et al., 2009). Fish farms have an ecological effect on the surrounding environment, which is noticeable not only at a benthic level (e.g. Naylor et al., 2000; Karakassis et al., 2000; Black, 2001; Dempster et al., 2004), due to sinking organic matter in the form of uneaten feed pellets and faeces (Fernandez-Jover et al., 2009; Black et al., 2012). Changes in the invertebrate assemblage structure (Fabi et al., 2009; Madin et al., 2009; Fernandez-Gonzalez et al., 2013) have been extensively studied in relation to the increase of organic matter sedimented from fish farms.

Most farmed marine fish are piscivorous species that require marine ingredients in their feed in order to achieve an optimal growth rate and health status (Naylor et al., 2000; Sargent et al., 2002; Fernandez-Jover et al., 2011). Nevertheless, current feeds also include high levels of vegetable oils in their composition, such as linseed, soybean, rapeseed or palm oil that are rich in saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) like oleic acid (18:1n-9, OA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) like linoleic acid (18:2n-6, LA) and α -linolenic acid (18:3n-3, LNA). Additionally, these vegetable oils present poor levels of the long chain PUFAs eicosapentaenoic acid (20:5n-3, EPA) and docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA), which are abundant in fish oils (Turchini et al., 2010; Fernandez-Jover et al., 2011) and become essential for fish, as well as arachidonic acid (20:4n-6, ARA). Large amounts of organic matter in the form of high energy fish feed rich in vegetable fatty acids are introduced into the environment, where uneaten pellets are consumed by wild fish which assemble near farms. In addition, fragmented pellets and faeces might represent a new trophic source for fouling organisms, providing them with a new source of terrestrial fatty acids such as LA and LNA, which are unusual in marine environments, and should be investigated (Sara et al., 2004; Fernandez-Jover et al., 2008; Arechavala-Lopez et al., 2011). If the above is true, it could modify their fatty acid composition; however, our knowledge of the extent to which the commercial feed affects different trophic levels is limited. It remains unclear which ecological compartments might be influenced by commercial feed entering the food chain. Changes in the fatty acid profile of the aggregated fauna have been detected by several authors (Skog et

al., 2003; Fernandez-Jover et al., 2007; Fernandez-Jover et al., 2009) but there is no full picture of the influence of fish farming on marine communities. Due to the composition of feed, fatty acids could be used as markers of feed consumption by marine communities attached to sea-cage structures, and as markers of lipidic waste accumulation on the sea-floor and in algal organisms. Several studies have proposed the use of fatty acid analysis to check the influence of aquaculture on the fatty acid composition of cage-associated fauna (zooplankton, sea-urchins, mussels, shrimps, fish and also sediments) (Samuelsen et al., 1988; Henderson et al., 1997; Cook et al., 2000; Skog et al., 2003; Gao et al., 2006; Fernandez-Jover et al., 2007; Olsen et al., 2009; Barberá et al., 2011), and many studies based on fatty acid profiles have concluded that food web relationships exist (Graeve et al., 1994; Scott et al., 1999). The effect of lost pellets have been studied by several authors (Sara et al., 2004; Vita et al., 2004; Sanz-Lázaro et al., 2011a, 2011b), mainly focusing on aggregated wild fish, and not taking into account the effect on other organisms such as macroinvertebrate species, zooplankton or seaweeds, that colonize the submerged fish farm structure. The present research focuses on the transfer of vegetable fatty acids from aquaculture wastes to the surrounding ecosystem, and looks for possible to detect changes in trophic behaviour due to the assimilation of organic matter derived from aquaculture activities. For this, we analyzed the modification of the fatty acid profile in different ecological compartments, with special attention to the incorporation of terrestrial fatty acids in marine macroinvertebrate communities, including a wide range of species belonging to different taxa, and zooplankton. We also analyzed the sediments below the sea-cages and various seaweed species because of their importance as natural trophic resources for fouling organisms.

2. Material and methods

2.1 Study site and field sampling

The study area was located off the south-east coast of Spain, in the western Mediterranean Sea (Fig. 1). Two fish farm facilities were selected to carry out the study: impact (an active fish farm facility; producing 900 t of fish per year) and control (a fish farm not used for production for the previous two years). From June to September 2010, samples of sediments below the sea cages, seaweeds, feed pellets, fish faeces and surrounding organisms were collected. Fish faeces suspended in the water column were collected using sediment traps deployed for 24 h. Horizontal plankton hauls were performed to collect zooplankton communities of each fish farm according to the main current. Fouling communities were collected by scraping mooring ropes covering the main habitats of algae, hydroids and mussels. After collection, samples were transferred to the laboratory in a cooling box with sea water, ice and air supply prior to identification. Sessile fouling organisms and the associated fauna were sorted, identified to species level whenever possible and frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. As well as the feed used at the sampling time, we tested the feed used in winter, because the presence of winter pellets in the area should not be discarded. At least three replicates were taken for each item, except for faeces (only one pool of faeces could be analyzed because of the difficulty involved in obtaining a big enough sample for fatty acid analysis).

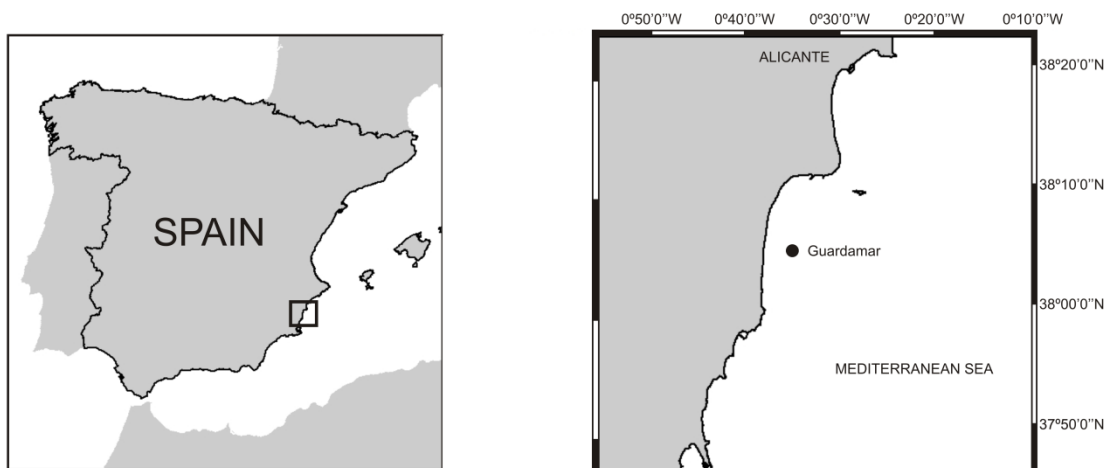


Figure 1. Location of the studied farms in Guardamar Bay, south-east coast of Spain, in the Western Mediterranean Sea.

Table 1. Phylum, Order and species (when possible) of sampled organisms. The number of replicates obtained is shown, as well as the use of pools in case of species of insufficient size. *Species with no replicates in either farm. Replicates of sediments are also included.

Phylum	Order	Specie	Replicates at Impact/control farms	Pools
Bryozoa	Cheilostomatida	<i>Schizoporella sp.</i>	6/3	+
Cnidaria	Anthozoa	<i>Actinaria sp.</i> (ACT)	3/3	+
Cnidaria	Hydrozoa	<i>Pennaria disticha</i> Goldfuss, 1820 (PEN)	3/3	+
Cnidaria	Hydrozoa	<i>Aglaophenia sp.</i>	3/3	+
Mollusca	Gastropoda	<i>Patella caerulea</i> Linnaeus, 1758 (PAT)	3/3	-
Mollusca	Bivalvia	<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819 (MYT)	3/3	-
Crustacea	Decapoda	<i>Pisidia longicornis</i> Linnaeus, 1767 (PIS) *	0/3	+
Crustacea	Decapoda	<i>Pachygrapsus transversus</i> Gibbes, 1850 (PAC)	10/4	+
Crustacea	Decapoda	<i>Pilumnus hirtellus</i> Linnaeus, 1761 (PIL)	6/9	+
Crustacea	Cirripedia	<i>Balanus sp.</i> (BAL)	3/3	+
Crustacea	Amphipoda	<i>Elasmopus sp.</i> (ELA)	3/3	+
Crustacea	Amphipoda	<i>Caprella equilibra</i> Say, 1818	3/3	+
Crustacea	Amphipoda	<i>Caprella dilatata</i> Krøyer, 1843 (DIL)	3/3	+
Crustacea	Amphipoda	<i>Jassa marmorata</i> Holmes, 1905 (JAS) *	1/3	+
Echinoidea	Arbacioida	<i>Arbacia lixula</i> Linnaeus, 1758	3/3	-
Echinoidea	Ophiurida	<i>Ophiotrix sp.</i> (OPHI) *	3/0	-
Polychaeta	Phyllodocida	<i>Polynoidae sp.</i> (POL)	3/3	-
Sipuncula	Phascolosomatida	<i>Phascolosoma stephensoni</i> Stephen, 1942 (PHA)	3/3	+
Rhodophyta	Corallinales	<i>Jania rubens</i> (Linnaeus) J.V. Lamouroux, 1816	3/3	+
Rhodophyta	Ceramiales	<i>Ceramium ciliatum</i> (J. Ellis) Ducluzeau, 1806	3/3	+
Chlorophyta	Ulvaes	<i>Ulva sp.</i> *	3/0	+
Chlorophyta	Cladophorales	<i>Cladophora sp.</i> *	0/3	+
		Zooplankton	4/4	+
		Sediments	6/5	+

2.2 Fatty acid analysis

Total lipids were extracted from 0.5-3.0 g of sample by homogenising in 20 ml of chloroform/methanol (2:1 v/v) in an Ultra Turrax tissue disrupter (IKA ULTRA-TURRAX T 25 digital, IKA-WERKE). Total lipids were prepared according to the method described by [Folch et al. \(1957\)](#) and non-lipid impurities were removed by washing with 0.88 % (w/v) KCl. The weight of lipids was determined gravimetrically after evaporation of the solvent and overnight desiccation in vacuum. Fatty acid methyl esters (FAME) were prepared by acid-catalysed transesterification of total lipids according to the method of [Christie \(2003\)](#), and the total lipid samples were transmethylated overnight in 2 ml of 1 % sulphuric acid in methanol (plus 1 ml of toluene to dissolve neutral lipids) at 50 °C. The methyl esters were extracted

twice in 5 ml hexane-diethyl ether (1:1, v/v) after neutralization with 2 ml of 2 % KHCO_3 , dried under nitrogen and redissolved in 0.5 ml of iso-hexane. FAME were separated and quantified by gas-liquid chromatography using an SPTM 2560 flexible fused silica capillary column (100 m long, internal diameter of 0.25 mm and film thickness of 0.20 mm; SUPELCO) in a HewlettePackard 5890 gas chromatograph. The oven temperature of the gas chromatograph was programmed for 5 min at an initial temperature of 140°C, and increased at a rate of 4 °C/min to 230 °C, further increased at a rate of 1°C/min to 240 °C and then held at that temperature for 6 min. The injector and flame ionization detector were set at 260 °C. Helium was used as carrier gas at a pressure of 300 kPa, and peaks were identified by comparing their retention times with appropriate FAME standards purchased from the Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Individual fatty acid concentrations were expressed as percentages of the total content.

2.3 Fatty acid markers

The n-3/n-6 index was used to detect alterations of the fatty acid profile due to feed consumption. Lower values indicate a reduction of the total n-3 fatty acid content, usually present in high proportions in marine organisms, and an increase in the n-6 fatty acid content, which are scarce in marine environments and indicative of terrestrial vegetable fatty acid uptake. Terrestrial fatty acid consumption was also assessed by the means of $\sum\text{LA};\text{LNA}$ and $\sum\text{OA};\text{LA}$ indices.

2.4 Statistical analysis

A t-test was performed to compare individual fatty acids between impact and control samples, using SPSS 15.0 for Windows. Fatty acid profiles of sea-cage fouling organisms were analyzed through multivariate analysis using the program Primer (Clarke and Gorley, 2006) (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research; v.6.1.13) and its complementary statistical package PERMANOVA+ (v.1.0.3). Principal component analysis (PCA) was carried out to show the relationship between the species according to the fatty acid percentages.

Variables that had the greatest influence on dissimilarities among fatty acids of the different species were calculated using the SIMPER (similarity percentages) procedure (Warwick et al., 1990; Clarke, 1993). A permutation test (PERMANOVA) comprising 4999 permutations was

used to assess the significance of the overall fatty acid composition between the samples of active and control farms for each species (Clarke, 1993; Anderson, 2004). When the number of possible permutable units was not enough to get a reasonable test by permutation, a p-value was obtained using a Monte Carlo test (Anderson and Robinson 2003). SIMPER analyses were performed using the Bray-Curtis dissimilarity index (Bray and Curtis, 1957) to obtain the degree of dissimilarity in species composition between the two farms studied. As data were percentages, they were transformed with arcsin ($x + 1$), and all statistical tests were performed with a significance level of $\alpha = 0.05$.

Table 2. Fatty acid percentages (mean values \pm SD) of both types of fishfeed used in the fish farm.

	Summer feed	Winter feed
14:0	5.51 \pm 1.98	7.02 \pm 0.12
15:0	0.33 \pm 0.12	0.43 \pm 0.00
16:0	14.24 \pm 0.56	18.32 \pm 0.18
18:0	2.98 \pm 0.05	3.22 \pm 0.02
20:0	0.29 \pm 0.05	0.28 \pm 0.00
22:0	0.22 \pm 0.09	0.18 \pm 0.01
Total saturated	23.57 \pm 2.48	29.45 \pm 0.29
16:1n-7	6.59 \pm 0.59	8.23 \pm 0.05
18:1n-9 (OA)	19.13 \pm 1.69	13.29 \pm 0.04
18:1n-7	2.80 \pm 0.67	2.94 \pm 0.00
20:1n-9	4.31 \pm 1.23	0.52 \pm 0.01
22:1n-9	2.23 \pm 0.05	0.12 \pm 0.01
24:1n-9	0.45 \pm 0.04	0.21 \pm 0.01
Total monounsaturated	35.51 \pm 0.64	25.30 \pm 0.05
18:2n-6 (LA)	9.32 \pm 0.29	15.54 \pm 0.04
18:3n-6	0.19 \pm 0.11	0.29 \pm 0.01
20:2n-6	0.56 \pm 0.01	0.28 \pm 0.00
20:3n-6	0.21 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01
20:4n-6 (ARA)	0.84 \pm 0.04	0.84 \pm 0.01
22:2n-6	0.03 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00
22:4n-6	0.05 \pm 0.05	0.05 \pm 0.04
Total n-6 PUFA	11.22 \pm 0.31	17.12 \pm 0.02
18:3n-3 (LNA)	0.27 \pm 0.02	2.09 \pm 0.10
18:4n-3	1.80 \pm 0.04	1.90 \pm 0.00
20:3n-3	0.50 \pm 0.06	0.03 \pm 0.05
20:5n-3 (EPA)	12.82 \pm 0.74	13.40 \pm 0.13
22:5n-3	1.89 \pm 0.11	1.03 \pm 0.01
22:6n-3 (DHA)	12.44 \pm 0.91	9.68 \pm 0.09
Total n-3 PUFA	29.71 \pm 1.77	28.13 \pm 0.30
Total PUFA	40.93 \pm 2.07	45.25 \pm 0.30

3. Results

3.1 Collected samples

A total of 18 macroinvertebrate species corresponding to the most representative species were collected from both the active and the control fish farm (Table 1). One species was found only in the control site (Crustacea, decapoda, *Pisidia longicornis*) and one only in the active farm (Echinoidea, ophiurida, *Ophiothrix* sp.). Furthermore, we collected sediments, four species of seaweeds and zooplankton samples from both active and control farms. Fish faeces were collected from the active farm, as well as two types of feed (winter and summer feed).

3.2 Fatty acid composition of feed and faeces

The feed fatty acid profile (Table 2) indicated a high percentage of SFA and MUFA, which together accounted for 55-59 % of both for winter and summer feeds. The PUFA content represented 40.93 % of the summer feed and 45.25 % of the winter feed, OA being the majority vegetable fatty acid in summer (19.13 %) and 16:0 and LA in winter (18.32 % and 15.54 %), while the LNA content was 0.27 % and 2.09 % and the DHA content 12.44 % and 9.68 % in summer and winter, respectively.

Faeces analysis indicated a high content of SFA (32.34 %) and MUFA (48.01 %) with an OA content of 28.71 % of the total lipid sample, and a low PUFA content (19.65 %), with LA being the major PUFA (9.71 %). Low values were obtained for ARA (0.34 %), LNA (0.32 %), EPA (2.76 %) and DHA (3.36 %).

3.3 Fatty acid composition of sediments and seaweeds

The levels of total lipids from the sediments collected below the active farm were significantly higher than in the control samples (0.64 % and 0.22 %, respectively), and presented higher levels of saturated (47.96 % and 40.98 %) and monounsaturated (37.26 % and 32.56 %) fatty acids, and lower levels of n-3 fatty acids (5.88 % and 17.91 %). The OA and LA contents were higher in the active farm site than in the control (23.17 % and 13.45 % for OA; 7.80 % and 5.34 % for LA), while ARA, EPA and DHA presented lower levels (0.23 % and 2.32 % for ARA; 1.95 % and 8.54 % for EPA; 1.82 % and 6.58 % for DHA). As these results suggest, the complete fatty acid profile was significantly different between farms, as seen by PERMANOVA analysis. ($P = 0.002$).

The calcareous seaweed *Jania rubens* presented a significantly lower percentage of LNA in samples from the active farm compared with the control farm (0.45 % vs. 2.11 %). The brown seaweed *Ceramium ciliatum* presented significant differences in EPA percentages, with higher levels in the active farm (19.52 % vs. 10.86 %). Two species of green seaweeds were found, *Ulva* sp. only in the active farm and *Cladophora* sp. only in the control site. Of note is the high OA percentage of *Ulva* sp. (21.04 %) and the LA and LNA percentages of *Cladophora* sp. (11.93 % and 10.97 %). Both EPA and DHA were present at low levels in *Ulva* sp. (3.43 % and 1.20 %) and in *Cladophora* sp. (2.58 % and 1.10 %)

3.4 Comparison of the populations of both impact and control fish farms

PERMANOVA pointed to significant differences between control and active farm groups for almost every species ($P < 0.005$), with the exception of *Schizoporella* sp., *Aglaophenia* sp., *Caprella equilibra*, *Arbacia lixula* and the zooplankton community. The SIMPER analysis showed that the dissimilarity was mainly due to OA (in *Actiniaria* sp., *Pennaria disticha*, *Mytilus galloprovincialis*, *Balanus* sp., *Caprella dilatata*, *Polynoidae* sp. and *Phascolosoma stephensoni*), its contribution being 10 % higher in most species that showed significant differences by PERMANOVA. Besides OA, DHA and LA, were also responsible to a great extent for the dissimilarity between the two fish farm facilities.

The t-test suggested a clear pattern, with higher values of OA being observed in samples of most species collected from the active farm, except *Schizoporella* sp. and *C. dilatata* (Table 3). As well as OA, LA showed significant differences in a relatively high number of species, with higher levels in farm samples than control samples. *Schizoporella* sp., *Aglaophenia* sp. and *C. dilatata* showed no difference in LA between farms. Species that showed significant differences in ARA had the same trend, with lower levels in the active farm. Total n-6 PUFA showed higher values in the active farm samples for the mollusk *M. galloprovincialis* and the crustaceans *Balanus* sp. and *C. equilibra*, and lower values for *Schizoporella* sp. There were significant differences in LNA between the control site and the active fish farm (higher in the former), with the exception of *Polynoidae* sp. which showed the opposite variation. EPA showed significantly higher levels in control samples. The species showing the lowest changes in DHA were in the active farm. In the same way, total n-3 PUFA percentages and total

Table 3. Most important individual fatty acid percentages (mean values \pm SD) of macroinvertebrates. Significant differences among the active and control farms are represented in both bold and italics.

	SFA		OA		MUFA		LA		ARA		PUFA n-6	
	Impact	Control	Impact	Control	Impact	Control	Impact	Control	Impact	Control	Impact	Control
<i>Schizoporella</i> sp.	39.41 \pm 8.72	39.37 \pm 0.56	11.61 \pm 4.36	6.82 \pm 0.26	21.96 \pm 7.24	14.94 \pm 0.69	3.83 \pm 1.15	4.44 \pm 0.31	2.76\pm0.63	4.00\pm0.53	11.27\pm1.15	13.15\pm0.76
<i>Actinaria</i> sp.	22.49\pm0.57	25.98\pm0.50	18.26\pm1.33	3.38\pm0.12	31.97\pm2.10	9.97\pm0.03	7.18\pm0.47	1.52\pm0.10	1.17\pm0.15	2.61\pm0.20	11.71 \pm 0.13	11.26 \pm 0.36
<i>Pennaria disticha</i>	34.74\pm0.75	46.65\pm2.02	14.05\pm0.65	6.25\pm1.09	24.11\pm0.41	13.51\pm0.56	4.63\pm0.20	2.33\pm0.06	8.05 \pm 0.90	9.36 \pm 0.91	14.21 \pm 0.89	13.75 \pm 0.71
<i>Aglaophenia</i> sp.	43.49 \pm 0.86	43.81 \pm 2.97	5.08\pm0.70	3.69\pm0.37	11.80\pm0.34	9.87\pm0.68	2.60 \pm 0.12	2.05 \pm 0.53	1.62 \pm 0.04	1.58 \pm 0.11	7.33 \pm 0.23	7.42 \pm 0.66
<i>Patella caerulea</i>	34.22 \pm 1.35	30.75 \pm 2.49	6.89\pm0.79	4.81\pm0.54	23.07 \pm 2.27	24.54 \pm 0.59	3.32\pm0.56	1.97\pm0.17	8.62 \pm 0.39	13.97 \pm 3.07	18.37 \pm 1.23	20.77 \pm 3.16
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	29.80 \pm 1.71	30.44 \pm 0.27	8.81\pm1.02	2.98\pm0.44	16.18\pm1.64	10.85\pm2.02	5.48\pm0.71	3.04\pm0.42	2.70 \pm 0.24	3.13 \pm 0.95	9.92\pm0.56	8.03\pm0.78
<i>Pisidia longicornis</i>	-	35.03 \pm 1.27	-	9.92 \pm 1.10	-	22.19 \pm 4.09	-	3.47 \pm 1.06	-	4.17 \pm 1.19	-	8.75 \pm 2.34
<i>Pachygrapsus transversus</i>	33.89\pm2.38	29.37\pm1.46	15.65\pm1.89	11.48\pm0.61	24.80\pm2.74	19.42\pm2.38	4.32\pm1.48	2.63\pm0.22	4.48\pm0.74	7.12\pm1.74	10.89 \pm 2.33	11.85 \pm 1.80
<i>Pilumnus hirtellus</i>	29.28 \pm 3.50	32.25 \pm 2.82	19.32\pm3.52	13.32\pm1.49	28.18\pm4.17	21.71\pm1.90	5.41\pm2.09	2.12\pm0.41	3.94\pm0.80	6.40\pm0.89	11.90 \pm 2.02	10.53 \pm 1.19
<i>Balanus</i> sp.	26.70 \pm 0.10	26.75 \pm 0.48	10.91\pm1.34	6.22\pm0.27	19.85\pm1.33	14.98\pm0.51	4.38\pm0.21	2.33\pm0.12	1.83 \pm 0.14	1.95 \pm 0.14	7.29\pm0.17	5.39\pm0.10
<i>Elasmopus</i> sp.	28.29 \pm 0.52	29.01 \pm 1.07	21.66\pm2.18	16.19\pm0.22	27.54\pm2.96	20.23\pm0.72	5.68\pm1.31	3.01\pm0.32	4.68\pm0.70	6.96\pm1.02	11.89 \pm 0.81	11.22 \pm 0.67
<i>Caprella equilibra</i>	27.94 \pm 4.46	27.85 \pm 1.14	15.51\pm1.06	9.65\pm0.22	22.18\pm0.57	16.24\pm0.49	5.16\pm0.82	2.73\pm0.03	3.75 \pm 0.74	4.48 \pm 0.40	10.52\pm0.27	8.61\pm0.32
<i>Caprella dilatata</i>	26.71 \pm 2.28	28.41 \pm 0.01	15.70 \pm 2.44	11.78 \pm 0.20	23.23 \pm 2.71	17.03 \pm 0.36	4.73 \pm 1.16	3.10 \pm 0.05	3.13\pm0.23	3.82\pm0.06	9.42 \pm 1.04	8.24 \pm 0.10
<i>Jassa marmorata</i>	26.89	27.10 \pm 1.14	18.32	13.09 \pm 0.32	23.92	18.89 \pm 1.18	4.75	2.69 \pm 0.12	3.11	4.04 \pm 0.29	9.14	7.87 \pm 0.39
<i>Arbacia lixula</i>	29.89 \pm 1.57	30.66 \pm 1.32	2.80\pm0.91	0.80\pm0.18	11.10 \pm 0.52	10.87 \pm 4.74	1.95\pm0.49	0.86\pm0.29	16.31 \pm 4.23	20.60 \pm 2.38	23.69 \pm 5.07	27.12 \pm 2.81
<i>Ophiotrix</i> sp.	31.82 \pm 1.45	-	7.27 \pm 6.00	-	21.77 \pm 6.60	-	3.11 \pm 1.99	-	7.71 \pm 1.96	-	14.76 \pm 1.14	-
<i>Polynoidae</i> sp.	25.92 \pm 0.40	26.76 \pm 2.13	13.25\pm1.60	7.60\pm1.41	22.01\pm1.66	17.78\pm1.64	4.30\pm0.39	2.30\pm1.07	3.56 \pm 0.13	3.45 \pm 1.23	13.11 \pm 0.23	10.45 \pm 3.87
<i>Phascolosoma stephensoni</i>	35.45 \pm 1.45	37.29 \pm 3.04	10.85\pm1.41	3.57\pm1.18	28.99\pm2.12	21.35\pm1.26	3.85\pm0.12	2.01\pm0.23	9.49 \pm 0.64	12.47 \pm 2.08	18.35 \pm 0.40	20.07 \pm 2.50

	LNA		EPA		DHA		PUFA n-3		Total PUFA	
	Impact	Control	Impact	Control	Impact	Control	Impact	Control	Impact	Control
<i>Schizoporella</i> sp.	0.93\pm0.46	2.08\pm0.21	5.87 \pm 1.68	6.35 \pm 0.69	17.13 \pm 4.23	21.07 \pm 0.35	27.36 \pm 6.99	32.53 \pm 1.03	38.63 \pm 7.91	45.68 \pm 0.55
<i>Actinaria</i> sp.	0.55\pm0.02	1.19\pm0.09	10.23\pm0.49	15.96\pm0.40	16.81\pm0.81	26.92\pm0.66	33.83\pm1.47	52.78\pm0.14	45.54\pm1.53	64.05\pm0.48
<i>Pennaria disticha</i>	0.56 \pm 0.58	1.06 \pm 0.01	8.02 \pm 0.54	6.79 \pm 1.66	16.03 \pm 0.49	15.78 \pm 1.56	26.94 \pm 0.42	26.09 \pm 3.25	41.15 \pm 0.48	39.84 \pm 2.58
<i>Aglaophenia</i> sp.	0.86 \pm 0.02	0.89 \pm 0.25	7.25 \pm 0.15	6.71 \pm 1.21	26.89 \pm 0.72	28.95 \pm 2.08	37.38 \pm 0.92	38.90 \pm 3.22	44.71 \pm 1.13	46.32 \pm 2.86
<i>Patella caerulea</i>	1.61\pm0.25	3.02\pm0.65	16.62 \pm 3.42	16.88 \pm 1.22	0.89 \pm 0.38	1.00 \pm 0.16	24.34 \pm 3.03	23.95 \pm 0.18	42.71 \pm 2.30	44.71 \pm 2.98
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	7.14 \pm 0.81	3.67 \pm 2.60	8.69 \pm 1.00	10.04 \pm 0.34	25.71\pm3.57	34.64\pm1.13	44.10 \pm 3.89	50.68 \pm 2.80	54.02 \pm 3.34	58.71 \pm 2.12
<i>Pisidia longicornis</i>	-	0.72 \pm 0.10	-	15.53 \pm 2.22	-	16.66 \pm 2.21	-	34.03 \pm 4.31	-	42.78 \pm 4.91
<i>Pachygrapsus transversus</i>	1.09 \pm 1.42	1.15 \pm 0.71	14.59\pm2.26	18.92\pm1.51	13.02\pm3.46	17.99\pm3.89	30.42\pm3.47	39.36\pm5.26	41.31\pm3.09	51.21\pm3.63
<i>Pilumnus hirtellus</i>	1.42 \pm 1.21	0.66 \pm 0.40	11.39\pm2.33	15.32\pm1.13	15.80 \pm 3.28	18.00 \pm 2.42	30.64 \pm 5.96	35.50 \pm 3.72	42.54 \pm 4.58	46.03 \pm 4.68
<i>Balanus</i> sp.	1.48 \pm 0.24	1.78 \pm 0.31	13.49\pm0.28	14.84\pm0.37	28.55\pm0.79	32.94\pm0.55	46.16\pm1.39	52.89\pm0.88	53.45\pm1.24	58.28\pm0.88
<i>Elasmopus</i> sp.	0.24 \pm 0.06	1.06 \pm 0.69	14.21 \pm 1.85	17.44 \pm 0.77	16.59 \pm 2.59	20.16 \pm 0.83	32.28 \pm 4.27	39.55 \pm 1.17	44.17\pm3.47	50.76\pm1.68
<i>Caprella equilibra</i>	2.21 \pm 1.92	0.70 \pm 0.38	15.29\pm1.88	19.98\pm0.52	20.06\pm0.87	24.89\pm0.68	39.36 \pm 4.75	47.30 \pm 1.25	49.88 \pm 5.02	55.91 \pm 1.02
<i>Caprella dilatata</i>	0.22 \pm 0.01	0.34 \pm 0.31	15.90\pm0.45	18.81\pm0.23	22.65 \pm 2.03	25.98 \pm 0.23	40.64\pm1.48	46.32\pm0.32	50.06\pm0.50	54.56\pm0.37
<i>Jassa marmorata</i>	0.85	0.79 \pm 0.09	18.59	20.45 \pm 0.29	19.12	23.32 \pm 1.85	40.05	46.14 \pm 1.99	49.19	54.01 \pm 2.32
<i>Arbacia lixula</i>	4.61 \pm 1.42	2.03 \pm 1.51	14.69 \pm 3.37	13.45 \pm 2.27	11.75 \pm 2.11	12.19 \pm 3.45	35.32 \pm 6.81	31.35 \pm 4.95	59.01 \pm 1.82	58.48 \pm 3.63
<i>Ophiotrix</i> sp.	9.92 \pm 6.07	-	17.04 \pm 1.61	-	2.80 \pm 1.02	-	31.65 \pm 5.98	-	46.41 \pm 6.21	-
<i>Polynoidae</i> sp.	5.69\pm0.10	4.04\pm0.18	11.09 \pm 0.75	14.13 \pm 3.32	19.83\pm1.24	24.45\pm1.65	38.96 \pm 1.94	45.00 \pm 4.44	52.07\pm1.84	55.45\pm0.97
<i>Phascolosoma stephensoni</i>	0.90 \pm 0.43	3.01 \pm 1.69	7.15\pm1.02	12.49\pm2.69	4.59 \pm 0.49	2.83 \pm 1.38	17.21 \pm 0.77	21.29 \pm 3.65	35.56\pm0.70	41.36\pm2.15

farm samples (only one pool). Zooplankton samples did not show significant differences for any studied fatty acid (data not shown). Species with no differences in their fatty acid profile (*Schizoporella* sp., *Aglaophenia* sp., *C. equilibra* and *A. lixula*) were also analyzed for changes in individual fatty acids. The ARA and LNA percentages of *Schizoporella* sp. were lower in the active farm, while the percentage of OA in *Aglaophenia* sp. was higher. *C. equilibra* presented higher percentages of both OA and LA in the active farm, and lower percentages of EPA and DHA. *A. lixula* also presented significantly higher percentages of OA and LA in the active farm.

The PCA results for feed and faeces, and species showing significant differences in the PERMANOVA analysis are given in Fig. 2a, with a total explained variance of 81.4 %. The representation of samples based on their fatty acid percentages shows two groups: The first characterized by samples with a high DHA content (most of them control samples) and high levels of LA and OA (most of them samples from the active farm, also including feed) and the other group characterized by their levels of ARA and LNA, and comprising just three species. Faeces were situated independently, because of their high content of OA and LA.

The group of species with a high ARA content was analyzed separately in a new PCA which explained 94.7 % of the total variance (Fig. 2b). Samples with a high ARA and 18:1n-7 content were characterized by low levels of LA, OA and DHA. Species with a relatively high DHA content are represented independently in Fig. 2c, with a total explained variance of 80.2 %. High levels of DHA were correlated with low levels of OA and *vice versa*, while high levels of ARA and EPA correlated with low levels of LA and 20:1n-9.

3.5 Fish feed consumption indices

Most samples from the active farm showed significantly higher values for the \sum LA;LNA and \sum OA;LA indices, with the exception of *Schizoporella* sp., while four species showed lower n-3/n-6 values compared with controls (Table 4).

Table 4. Mean values (\pm SD) of consumption indices of fish feed (Σ LA; LNA, Σ OA; LA, and n-3/n-6). Significant differences between the active and control farms are represented in both bold and italics.

	n-3/n-6		Σ (LA; LNA)		Σ (OA; LA)	
	Impact	Control	Impact	Control	Impact	Control
<i>Schizoporella sp.</i>	2.41 \pm 0.47	2.48 \pm 0.21	<i>4.76\pm1.19</i>	<i>6.52\pm0.40</i>	15.44 \pm 5.43	11.25 \pm 0.05
<i>Actinaria sp.</i>	<i>2.89\pm0.12</i>	<i>4.69\pm0.14</i>	<i>7.73\pm0.45</i>	<i>2.71\pm0.15</i>	<i>25.45\pm1.80</i>	<i>4.90\pm0.05</i>
<i>Pennaria disticha</i>	1.90 \pm 0.15	1.91 \pm 0.34	<i>5.19\pm0.76</i>	<i>3.40\pm0.07</i>	<i>18.68\pm0.85</i>	<i>8.58\pm1.14</i>
<i>Aglaophenia sp.</i>	5.10 \pm 0.07	5.29 \pm 0.85	3.47 \pm 0.14	2.94 \pm 0.78	7.68 \pm 0.82	5.75 \pm 0.89
<i>Patella caerulea</i>	1.33 \pm 0.23	1.17 \pm 0.17	4.93 \pm 0.77	4.99 \pm 0.81	<i>10.20\pm1.31</i>	<i>6.78\pm0.64</i>
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>4.47\pm0.66</i>	<i>6.37\pm0.90</i>	12.62 \pm 1.46	6.71 \pm 3.00	<i>14.29\pm1.70</i>	<i>6.02\pm0.85</i>
<i>Pisidia longicornis</i>	-	4.12 \pm 1.39	-	4.19 \pm 1.06	-	13.39 \pm 1.27
<i>Pachygrapsus transversus</i>	2.94 \pm 0.82	3.44 \pm 1.01	5.42 \pm 2.65	3.78 \pm 0.78	<i>19.97\pm2.45</i>	<i>14.11\pm0.71</i>
<i>Pilumnus hirtellus</i>	2.70 \pm 0.91	3.38 \pm 0.25	<i>6.83\pm2.25</i>	<i>2.77\pm0.54</i>	<i>24.73\pm5.57</i>	<i>15.44\pm1.78</i>
<i>Balanus sp.</i>	<i>6.34\pm0.33</i>	<i>9.82\pm0.26</i>	<i>5.86\pm0.05</i>	<i>4.11\pm0.21</i>	<i>15.29\pm1.54</i>	<i>8.56\pm0.30</i>
<i>Elasmopus sp.</i>	2.74 \pm 0.57	3.53 \pm 0.17	5.92 \pm 1.37	4.07 \pm 0.50	27.34 \pm 3.48	19.20 \pm 0.36
<i>Caprella equilibra</i>	<i>3.74\pm0.36</i>	<i>5.50\pm0.33</i>	7.38 \pm 2.74	3.43 \pm 0.39	<i>20.67\pm1.86</i>	<i>12.37\pm0.22</i>
<i>Caprella dilatata</i>	4.36 \pm 0.68	5.62 \pm 0.07	4.94 \pm 1.15	3.44 \pm 0.35	20.42 \pm 3.60	14.87 \pm 0.18
<i>Jassa marmorata</i>	-	5.87 \pm 0.17	-	3.48 \pm 0.06	-	15.77 \pm 0.23
<i>Arbacia lixula</i>	1.59 \pm 0.72	1.17 \pm 0.30	6.55 \pm 1.80	2.89 \pm 1.72	<i>4.74\pm1.39</i>	<i>1.66\pm0.47</i>
<i>Ophiotrix sp.</i>	2.15 \pm 0.40	-	13.04 \pm 4.08	-	10.38 \pm 7.99	-
<i>Polynoidae sp.</i>	2.97 \pm 0.18	4.75 \pm 1.82	<i>9.99\pm0.46</i>	<i>6.34\pm1.16</i>	<i>17.54\pm1.98</i>	<i>9.90\pm0.49</i>
<i>Phascolosoma stephensoni</i>	0.94 \pm 0.05	1.08 \pm 0.29	4.75 \pm 0.45	5.02 \pm 1.55	<i>14.70\pm1.53</i>	<i>5.58\pm0.95</i>

4. Discussion

Almost every macroinvertebrate species presented different fatty acid profiles for the farm and control samples. Briefly, animals sampled close to the active farm tended to have higher levels of OA and LA, and lower levels of ARA, EPA and DHA, which reflects the composition of the feed and faeces, both rich in OA and LA. The results of this study support previous findings that identified changes in the fatty acid profiles for fish species (Fernandez-Jover et al., 2007; Fernandez-Jover et al., 2009; Fabi et al., 2009), mainly as a result of terrestrial fatty acids being consumed by the nearby fauna. As well as feed pellets, faeces must be taken into consideration for the purpose of this study, as faeces and pellets are the main cause of any increase in particulate organic matter around fish farms (Pérez et al., 2013). Previous research showed that the macrofouling fauna could take advantage of faeces from cultured fish (Madin et al., 2009). The fatty acid analysis of the faeces showed agreed with the results of Van Biesen and Parrish (2005), with a high proportion of MUFA (48.01 %) and low proportion of PUFA (19.65 %) due to the former's poor digestibility by fish. Due to the high content in OA, and given that SIMPER results identified this fatty acid as the major contributor to the differences between farms, faeces could be used as a trophic resource. We also found different sediment fatty acid profiles, in which OA and LA presented higher percentages than the control in sediments from the active farm, with a consequent reduction in EPA and DHA, supporting the idea of the accumulation of feed and faeces wastes, as mentioned by other authors (Mantzavrakos et al., 2007; Tomassetti et al., 2009; Sanz-Lázaro et al., 2011b; Black et al., 2012). Not only sediments but also seaweeds presented significantly different total fatty acid profiles, although some changes were the opposite of those found for macroinvertebrates, with higher EPA levels in farm samples of *C. ciliatum* and lower LNA levels in farm *J. rubens* samples.

Previous studies in the same area showed significantly higher levels of pellet-derived fatty acids in zooplankton samples taken from fish farms compared with samples taken from control areas, with higher values of LA and LNA and lower values of DHA (Fernandez-Jover et al., 2009). Nevertheless, our farm-associated plankton samples were not affected by the remnants of feed pellets, and there were no differences in this respect between the active farm and the control facilities. Since zooplankton is consumed by a variety of species and no retention of vegetable fatty acids by zooplankton was evident, the accumulation of vegetable

fatty acids in the studied macroinvertebrates was probably due to their incorporation from other sources, presumably the waste feed and faeces from the aquaculture activity in question.

Some populations of invertebrates seem flourish as a result of fish farming activities. Such is the case of the brittle star, *Ophiothrix* sp., which was not found in the control farm, whereas a great number of them were seen in the active farm. Other authors have detected a similar pattern for starfish abundance, which increased up to 10-fold in the proximity to aquaculture farms due to the increased food supply (D'Amours et al., 2008). Several invertebrates showed an increase on some PUFA levels. For example, the mollusk *Patella caerulea* and, particularly, the sea urchin *A. lixula* were characterized by high levels of ARA, probably due to the ingestion of algae rich in this fatty acid. The grazing behaviour of a great variety of sea urchins (Greene and Grizzle, 2007; Wangensteen et al., 2011) and mollusks such as *P. caerulea* (Della Santina et al., 1993; Lorenzen, 2007) is well known, and they take advantage of algae growing on the surface of rocks and the seabed. At the same time, the fatty acid percentages of *A. lixula* were in agreement with those found by Carboni et al. (2013), who suggested a possible *de novo* synthesis of long chain PUFA in the sea urchin *Spatangus aureus* starting from LA, which continued to show very low levels, as we found in control *A. lixula* samples (0.86 %). *Ophiothrix* sp and *P. stephensoni* also showed high ARA levels as well. Echinoderms in general seem to be rich in ARA, as seen in other studies (Copeman and Parrish, 2003; Howell et al., 2003; Barberá et al., 2011), and it could be essential for gametogenesis and stress responses. Due to their passive feeding behaviour, *M. galloprovincialis* and *Balanus* sp., and the three studied cnidarians, cannot “choose” food particles or faeces, but they were exposed to them as they are sessile organisms, resulting in a higher OA content in farm samples, suggesting fish feed or faeces intake. Benthic polychaetes have been shown to be good indicators of fish farm-related pollution (Martinez-Garcia et al., 2013) but no information is available for fouling-associated polychaetes. Our results point to higher levels of the vegetable fatty acids (OA, LA and LNA) in *Polynoidae* sp. at the active farm. Benthic amphipods seem to respond negatively to aquaculture wastes since their population size and species diversity decrease in the sediment below the cages (Fernandez-Gonzalez et al. 2013). However, fish farming facilities such as ropes or buoys can support high densities of amphipods, especially caprellids, which are associated with fouling communities (Greene and Grizzle, 2007; Fernandez-Gonzalez and Sanchez-Jerez, 2014).

Caprellid amphipods are mainly detritivorous (Guerra-García and Tierno de Figueroa, 2009), and Guerra-García et al. (2004) showed that caprellids generally present relatively high proportions of EPA and DHA, which agrees with our results in the control farm. In the active farm, significantly lower levels of DHA were found in *C. equilibra*, and of EPA in *C. equilibra* and *C. dilatata*, possibly due to a shift in diet, involving the greater consumption of feed wastes than in a natural diet (although the total fatty acid profile of *C. equilibra* showed no significant change between farms). Nevertheless, Koussoroplis et al. (2011) concluded that primary consumers like amphipods could retain and accumulate high amounts of highly PUFA (EPA, DHA) in their tissues, being those available for predators. Hall et al. (2006) showed that some crab species may synthesize ARA, EPA and DHA *de novo* from their precursors LA and LNA. The crab species in our study, *P. transversus* (omnivorous) and *Pilumnus hirtellus* (scavenger), showed higher LA values in the fish farm, while ARA levels showed a reduced percentage, so that *de novo* synthesis of ARA can be dismissed in these crab species. The high levels of OA in active farm samples and reduced levels of EPA in both crab species, and reduced DHA in *P. transversus* suggest a strong influence of sea-cage wastes in crabs.

As mentioned above, fatty acids are transferred from primary producers to higher trophic levels, generally without change. This has led to several authors to use fatty acids as biomarkers for different food sources and to trace trophic relationships in marine organisms (Parrish et al., 2000; Dalsgaard et al., 2003; Shin et al., 2008; Perga et al., 2009) based on specific fatty acids or ratios between them. For example, the use of fatty acids containing more than 24 carbons (Sun et al., 2000) and $\Sigma 18:2n-6+18:3n-3$ to trace the consumption of vascular plants has been suggested (Wannigama et al., 1981; Dalsgaard et al., 2003; Hall et al., 2006). In this work we used LA, LNA, OA and the n-3/n-6 ratio as biomarkers in order to highlight the transfer of terrestrial fatty acids from fish feed and faeces. A general pattern was found whereby species showed a significant decrease in the n-3/n-6 ratio in farm samples, compared to the control samples. In the same way, several species showed significant differences in $\Sigma LA;LNA$ between the farms, as a result of an increase in the total content of these terrestrial fatty acids. Nevertheless, the feed used in the impact farm at the sampling time presented a high percentage of OA (19.13 %) compared to LA (9.32 %), and minimal levels of LNA (0.27 %). Consequently, $\Sigma LA;LNA$ does not seem to be the most suitable

index for tracing feed consumption, and a more useful new index might be $\sum\text{OA;LA}$, which reflects more closely the contribution of vegetable fatty acids from the feed. Indeed, improved results were obtained with $\sum\text{OA;LA}$, which identified an increase in these fatty acids as a result of their uptake from feed in 12 of the studied species, as well as an increase in their percentage in sediment.

The present study demonstrates the great influence of feed wastes derived from aquaculture activity in the organisms that live attached to the submerged structure of the sea-cages. Almost every macroinvertebrate species collected from the active fish farm presented a significant alteration of their fatty acid profile, the percentage of OA being mainly responsible for these differences. These modified profiles were influenced by the fatty acid composition of the fish feed and faeces, demonstrating the use of the remnants of food pellets and faeces by surrounding organisms, which generally reach denser populations in the active farm (personal observation). The combined use of the indices $\sum\text{OA;LA}$ and $\sum\text{LA;LNA}$ could be suitable for checking the influence of vegetable fatty acids, since not all feeds have the same fatty acid composition and changes in the type of feed used depends on the seasonality and the fish species farmed.

Although different taxa could have different fatty acid metabolic pathways, thus modifying their fatty acid profile (Pollierer et al., 2010), markers of terrestrial fatty acid consumption were clearly detected, allowing the effects of the introduction of these artificial pellets in the food web in aquaculture areas to be studied. In light of the obtained results, fatty acid analysis can be considered a good tool for assessing fish farm impact on sensitive species. We consider *Polynoidae* sp., *Actiniaria* sp., *M. galloprovincialis*, *P. transversus*, and *C. equilibra* as the most sensitive species to fatty acid changes in this study, and most species, even those occupying different ecological niches took advantage of sea-cage derived wastes. Just four species (*Schizoporella* sp., *Aglaophenia* sp., *C. dilatata* and *A. lixula*) and the zooplankton showed no differences in their total fatty acid profile between farms, so it can be presumed that these species do not ingest lost pellets or faeces, or at least not in significant amounts. Unfortunately, direct comparisons were not possible in some species, as no controls of *Ophiothrix* sp. were found, and just a few individuals of *J. marmorata* and no samples of *P. longicornis* were obtained from the farm. Whether the changes found in the fatty acid composition could represent negative consequences for the biology of the attached species

remains unclear, and more research is needed to elucidate possible effects on the regulation of the immune capacity and reproduction in marine invertebrates. In this way, we will be able to get a better understanding of the possible consequences of aquaculture wastes on the benthic and pelagic communities.

5. Conclusions

This work demonstrates that aquaculture activities have an influence on almost every macroinvertebrate species associated with fish farm sea-cage structures, taking advantage of uneaten feed pellets and faeces. The study of fatty acid profiles confirmed the accumulation of terrestrial fatty acids in a high number of species, as well as in sediments and, to a lesser extent, seaweeds, making fatty acid analysis a reliable tool for assessing the impact of sea-cages on the surrounding fauna. The uptake of feed wastes by the macrobenthic fauna might be a beneficial effect, since they reduce its accumulation and use by bacteria, thus preventing the appearance of anoxic zones. Nevertheless, although no negative effects could be detected from this work, the results suggest that better control of aquaculture-derived wastes is necessary to protect the surrounding wild fauna and their feeding behaviour.

Acknowledgements

We would like to express our gratitude to Laura Martínez Rubio from the Nutrition Group at the Institute of Aquaculture (University of Stirling) for her help and advice with the technical aspects of this work. We are also grateful to Marina Aboal for her help in seaweed taxonomy. Thanks are also given to the anonymous referees for their comments and for improving the work. This work was funded by the project FATFISH CTM2009-14362-C02-02 and FPI predoctoral grant from Ministerio de Economía y Competitividad (Government of Spain). This work forms part of a PhD thesis study undertaken by the first author.

General discussion

The results obtained from juveniles of *L. aurata* in laboratory conditions confirmed the usefulness of LNA, but especially of LA, as markers to track the consumption of aquafeeds, due to their rapid accumulation in flesh after shifting to a commercial feed consumption, and to their persistence in flesh, brain and liver after a two month wash-out period. These results may be extrapolated to wild fish aggregated to fish farm and thus modifying their diets from a natural diet to an aquaculture waste consumption, which has been demonstrated by the fatty acid profiles of the four species of wild fish captured at three different distances from fish farm facilities. More importantly, LA and LNA percentages accumulated in tissues of *L. aurata* did not return to their original values at the end of the experiment after two months of a wash-out period with the natural diet. Indeed, the percentages of the essential fatty acids ARA and DHA in flesh samples from fish which consumed the commercial feed during two months were lower than in fish from the control group, even at the end of the wash-out period, and similar results were found by other authors (Almáida-Pagán et al. 2007; Bell et al. 2003; Mourente et al. 2005; Regost et al. 2003).

Flesh reflects the fatty acid composition of the aquafeeds in a short time after change the diet. In this respect, brain has been demonstrated to be a more conservative tissue (Moore 1990; Soengas and Aldegunde 2002) although it, too, reflects changes related to the fatty acid composition of the diet. This property makes brain a useful tool for tracking alterations in the diet of wild fish through fatty acid analyses, especially in conjunction with flesh. While the flesh shows changes that may occur on a short time scale, the brain is capable of showing the accumulation of fatty acids of vegetable origin on a long time scale. Even if fish revert to a natural diet consumption for a sufficiently long time to allow the flesh to reflect this diet, changes may still be detectable in brain, so the combined use of both flesh and brain tissues is highly encouraged.

Fatty acids are known to they have a role in the maintenance of the lipid homeostasis through interaction with nuclear receptors NF κ B, PPARs and SRBEP, which regulate gene expression and affects to the lipid metabolism, besides cellular differentiation and inflammatory responses among others (Hwang and Rhee 1999; Schmitz and Ecker 2008; Tocher 2003). The brain ARA percentage in golden mullet consuming the natural or the commercial diet remained at higher levels than the percentages of this fatty acid in the natural

feed or the commercial feed, suggesting that ARA may play an important physiological role in brain of golden mullet. Specific retention of this fatty acid in brain may be possible (Koussoroplis et al. 2011), but we did not find evidences of retention of ARA in flesh or liver. A brain-specific capacity (of the eurihaline golden mullet to desaturate and elongate LA to ARA may be another explanation. Although it was not possible to go in depth about this question along the development of this thesis research, adequate primer sequences for qPCR analysis were obtained for future studies of gene expression of elongase 5 and $\Delta 6$ desaturase, and their possible modulation by dietary fatty acids in brain of *L. aurata*.

Histological examination of the liver of golden mullet showed no alterations in the normal tissue structure due to change from a natural diet to a commercial feed, although some specimens had livers with a high inclusion of lipid vacuoles in both periductular and non-periductular zones, giving an appearance of hepatic steatosis to those samples (after 60 days of commercial feed consumption). In any case, this group showed no significant differences in lipid area percentage compared to the control group, which agrees with the absence of significant differences in the total lipid content measured in the fatty acid analyses. Therefore, it can be concluded that liver function does not seem to be affected by the changes in its fatty acid profile due to the shift from natural to a commercial diet.

The shift to aquafeeds consumption reflected alterations of some immune parameters, such as decreased bactericidal activity against *P. damsela* (but increased against *E. coli*) increased phagocytic capacity and decreased respiratory burst activity, which agree with results from other authors (Montero et al. 2010, Bell et al. 1996, Mourente et al. 2005). Consumption of high amounts of n-3 fatty acids displaces n-6 fatty acids such as ARA in cell membrane phospholipids, diminishing the production of ARA-derived eicosanoids (Calder 2006), which are more biologically potent than EPA-derived eicosanoids (Calder 2006; Kelley and Rudolph 2000), and inhibiting the ARA metabolism. In this regard, the n-3/n-6 ratio is more important than absolute amounts of specific fatty acids (Russo 2009), and we speculate that the observed alterations on some immune parameters are related to the modification of both dietary, and tissues n-3/n-6 ratio, with no general negative effects associated to the shift in diet. Nevertheless, the contradictory results found in the literature, together with the possible influence of other components of the artificial diets different from fatty acids, entails that more

research is needed to elucidate the possible consequences on the immune system of aggregated wild fish foraging in aquaculture wastes.

Aquaculture sites attract and concentrate large quantities of wild fish from contiguous areas (Dempster et al. 2009), being the main attracting factor the availability of high energy feed in form of lost pellets that directly feeds the aggregated wild fish (Fernandez-Jover et al. 2008; Tuya et al. 2006). Even some predator species may change their diet to the consumption of aquaculture wastes, while other species take advantage of the high number of potential preys that can be found around the seacages. The study of the fatty acid profile of wild species captured in the vicinity of fish farms, and at medium and long distance, confirmed the results obtained in the first chapters of this thesis, and agree with those found by several authors in wild fish (Alasalvar et al. 2002; Arechavala-Lopez et al. 2011; Fernandez-Jover et al. 2007, 2009, 2011; Fuentes et al. 2010; Grigorakis et al. 2002; Ramírez et al. 2013; Skog et al. 2003): farm-associated wild fish present an altered fatty acid profile in several tissues, and this effect attenuates with increasing distance to the aquaculture facilities. Generally, the increase of OA and LA, and the decrease of DHA, were the main responsible for the differences found between control and farm-associated wild fish, being LA the only fatty acid which significantly accumulated in all studied tissues from farm-associated fish in the four species captured. The predator *P. saltatrix* becomes in a good example of fatty acids transfer through different trophic levels. High amounts of LA are present in the aquafeeds, and accumulates in the body tissues of aggregated wild fish via lost pellets consumption, and then is transferred and accumulated in the tissues of *P. saltatrix* via predation of aggregated wild fish. Fish captured by trawlers at long distances from the fish farms showed the most unaltered fatty acid profiles, and it may be of consideration when using as control the wild fish captured in a bay or area with aquaculture sites, as some individuals could present accumulation of fatty acids of terrestrial origin due to recent fish feed consumption, while fish captured off shore may represent the most natural lipid profiles, as those fish consume only natural preys.

Increases in the fat content and condition factor result in an increase in fecundity and hatching success, although egg quality and larvae survival rate could be affected by the low levels of DHA, and n-3 fatty acids in general, provided by artificial diets (Adams 1999;

Almansa et al. 1999; Fernández-Palacios et al. 1995; Izquierdo et al. 2001). Gonads from farm-associated *M. barbatus* showed an acceleration of the final stages of the oocyte development. Nevertheless, despite accumulation of LA, together with a decrease in the DHA percentages and in the n-3/n-6 ratio, no negative effects were found in the histological and morphometrical observation of the ovaries, which suggest that the impact of aquaculture activities on reproduction of wild fish populations due to modifications of the fatty acid profile, may not be of high magnitude.

Not only fish but also the macrofouling fauna associated to the submerged structures of a fish farm take advantage of the exceed feed. Briefly, animals sampled close to the active farm tended to have higher levels of OA and LA, and lower levels of ARA, EPA and DHA, which reflects the composition of the feed and faeces, both rich in OA and LA. The same trends were found in algae and sediments below the seacages, showing that the alterations of the fatty acid profile cover almost the whole ecosystem in the nearby area of the fish farms.

Fatty acids are transferred from primary producers to higher trophic levels, generally without change. This has led to several authors to use fatty acids as biomarkers for different food sources and to trace trophic relationships in marine organisms (Parrish et al. 2000; Dalsgaard et al. 2003; Shin et al. 2008; Perga et al. 2009) based on specific fatty acids or ratios between them. This thesis demonstrates the usefulness of fatty acid analysis to trace assimilation of aquaculture wastes as a new trophic resource for almost all the organisms associated to fish farms, being LA the most useful when tracking aquaculture waste consumption, at least in teleost species. LNA and OA may be also of interest, but the choice of good markers may always depend on the aquafeeds fatty acid composition.

Conclusions

The main conclusions of the present thesis are:

1. Two weeks of commercial feed consumption is sufficient to modify the flesh fatty acid profile in the studied species. Two months of wash-out period following two months of commercial feed consumption, is not enough time to recover the original fatty acid profiles of flesh, brain and liver.
2. At least two months of commercial feed consumption showed no influence on the liver histological structure and lipid droplet distribution.
3. The combined use of both flesh and brain tissues is encouraged in order to obtain a complete feeding history of wild fish.
4. Some immune parameters may be modulated by the shift in diet when wild fish arrive for first time to the vicinity of fish farms, with no negative effects associated to the shift to a commercial feed consumption.
5. Aggregated wild fish of different feeding behaviour accumulate fatty acids of vegetable origin in flesh, brain, liver and gonads, via lost pellets consumption or by predation of preys which have consumed aquafeeds. These effects could be present, in lower magnitude, in fish captured at higher distance from the fish farms (minimum 1.5 km).
6. The ovary of *M. barbatus* associated to fish farms presents an acceleration of the final stages of the oocyte development, with no apparent negative effects.
7. Aquaculture activities have an influence on fatty acid profiles of sediments, algae and almost every macroinvertebrate species associated with fish farm sea-cage structures.
8. The use of fatty acid analysis result in a usefulness technique to trace asimilation of aquaculture wastes as a new trophic resource for almost all the organisms associated to fish farms.
9. The sum of linoleic acid and α -linolenic acid result in a good biomarker of vegetable oils consumption through aquaculture wastes in teleost fish. A more useful new index for macroinvertebrate species might be the sum of oleic acid and linoleic acid, when they reflect more closely the contribution of vegetable fatty acids from the feed.

General conclusions:

Fatty acid profiles reflected the feeding behaviour of the farm-associated fauna, suggesting that fish and macroinvertebrate species take advantage of aquaculture wastes, contributing to reduce its accumulation in surrounding area. Wild fish may adapt their physiology to the new dietary conditions when they arrive and remain in the vicinity of fish farms, with no apparent negative effects on liver function, immunology and reproduction. Migrating to distant areas is no guarantee of early recovering the natural fatty acid profiles, and long term negative effects can not be concluded.

Supplementary material: Chapter 1

Table S1. Flesh fatty acid profile. Significant differences between diets are represented in red italics.

	0 days		30 days		60 days		90 days		120 days	
	Control		CD group	Control group	CD group	Control group	CD group	Control group	CD group	Control group
14:0	4.70 ±0.09		4.05 ±0.03	4.41 ±0.21	4.32 ±0.79	4.75 ±0.20	<i>4.31 ±0.05</i>	<i>4.91 ±0.51</i>	<i>4.37 ±0.04</i>	<i>4.96 ±0.07</i>
15:0	0.38 ±0.01		0.36 ±0.01	0.38 ±0.01	0.33 ±0.05	0.37 ±0.02	0.36 ±0.03	0.39 ±0.04	0.37 ±0.01	0.40 ±0.01
16:0	24.62 ±0.46		<i>21.60 ±0.62</i>	<i>24.21 ±0.79</i>	<i>21.95 ±2.16</i>	<i>23.82 ±0.57</i>	<i>21.84 ±0.39</i>	<i>23.87 ±1.09</i>	<i>22.32 ±0.55</i>	<i>24.31 ±0.88</i>
18:0	2.80 ±0.12		3.17 ±0.15	2.69 ±0.09	<i>2.88 ±0.22</i>	<i>2.24 ±0.13</i>	2.57 ±0.41	2.63 ±0.28	2.81 ±0.14	2.90 ±0.46
20:0	0.20 ±0.02		0.20 ±0.01	0.16 ±0.02	0.22 ±0.05	0.16 ±0.00	0.18 ±0.04	0.12 ±0.10	0.20 ±0.04	0.19 ±0.03
22:0	0.15 ±0.02		0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	<i>0.27 ±0.26</i>	<i>0.07 ±0.06</i>	0.07 ±0.11	0.00 ±0.00	0.08 ±0.13	0.05 ±0.09
Total saturated	32.84 ±0.57		<i>29.38 ±0.50</i>	<i>31.86 ±0.86</i>	29.98 ±3.08	31.40 ±0.48	<i>29.33 ±0.98</i>	<i>31.92 ±1.55</i>	<i>30.15 ±0.89</i>	<i>32.81 ±0.45</i>
16:1n-9	0.52 ±0.04		0.37 ±0.01	0.45 ±0.07	0.44 ±0.06	0.47 ±0.08	0.36 ±0.04	0.42 ±0.02	0.38 ±0.02	0.46 ±0.06
16:1n-7	10.64 ±0.38		<i>8.35 ±0.13</i>	<i>10.18 ±0.18</i>	<i>8.83 ±1.28</i>	<i>10.97 ±0.61</i>	<i>9.32 ±0.33</i>	<i>10.63 ±1.40</i>	8.92 ±0.57	9.69 ±0.75
18:1n-9	20.72 ±1.08		19.91 ±0.83	18.81 ±0.18	<i>22.28 ±1.63</i>	<i>20.30 ±0.33</i>	20.66 ±0.80	19.74 ±0.51	21.77 ±0.24	20.20 ±1.79
18:1n-7	5.04 ±0.10		4.58 ±0.07	4.73 ±0.04	4.71 ±0.26	4.61 ±0.21	4.60 ±0.04	4.59 ±0.17	4.52 ±0.06	4.52 ±0.32
20:1n-11	0.42 ±0.02		<i>0.00 ±0.00</i>	<i>0.48 ±0.04</i>	0.25 ±0.04	0.51 ±0.03	0.00 ±0.00	0.13 ±0.23	0.00 ±0.00	0.21 ±0.37
20:1n-9	2.80 ±0.09		2.53 ±0.10	3.05 ±0.15	<i>1.80 ±0.05</i>	<i>3.39 ±0.23</i>	<i>2.98 ±0.32</i>	<i>4.05 ±0.72</i>	<i>2.88 ±0.06</i>	<i>4.62 ±0.67</i>
20:1n-7	0.56 ±0.02		0.46 ±0.01	0.49 ±0.06	<i>0.38 ±0.02</i>	<i>0.47 ±0.05</i>	<i>0.45 ±0.02</i>	<i>0.46 ±0.01</i>	<i>0.41 ±0.01</i>	<i>0.46 ±0.02</i>
22:1n-11	1.42 ±0.08		<i>0.98 ±0.09</i>	<i>1.62 ±0.05</i>	<i>0.79 ±0.12</i>	<i>1.83 ±0.13</i>	<i>1.34 ±0.34</i>	<i>2.04 ±0.45</i>	<i>1.17 ±0.06</i>	<i>2.35 ±0.69</i>
22:1n-9	0.26 ±0.01		0.21 ±0.06	0.26 ±0.00	0.17 ±0.03	0.29 ±0.03	0.15 ±0.05	0.27 ±0.01	0.20 ±0.04	0.26 ±0.16
24:1n-9	0.00 ±0.00		0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00
Total monounsaturated	42.38 ±1.33		<i>37.38 ±0.92</i>	<i>40.07 ±0.18</i>	<i>39.65 ±3.45</i>	<i>42.86 ±0.73</i>	<i>39.87 ±0.50</i>	<i>42.34 ±1.32</i>	<i>40.26 ±0.86</i>	<i>42.77 ±1.50</i>
18:2n-6	2.66 ±0.20		<i>7.97 ±0.61</i>	<i>2.44 ±0.49</i>	<i>9.59 ±1.71</i>	<i>1.91 ±0.31</i>	<i>7.26 ±0.53</i>	<i>2.46 ±1.38</i>	<i>7.87 ±0.21</i>	<i>1.37 ±0.11</i>
18:3n-6	0.16 ±0.01		<i>0.21 ±0.01</i>	<i>0.16 ±0.04</i>	<i>0.20 ±0.00</i>	<i>0.11 ±0.03</i>	<i>0.19 ±0.02</i>	<i>0.10 ±0.01</i>	<i>0.17 ±0.02</i>	<i>0.08 ±0.01</i>
20:2n-6	0.33 ±0.02		0.41 ±0.03	0.37 ±0.04	<i>0.38 ±0.08</i>	<i>0.32 ±0.01</i>	0.38 ±0.01	0.31 ±0.03	0.37 ±0.03	0.32 ±0.04
20:3n-6	0.20 ±0.01		0.23 ±0.02	0.21 ±0.01	<i>0.16 ±0.03</i>	<i>0.19 ±0.01</i>	0.21 ±0.00	0.21 ±0.01	<i>0.18 ±0.02</i>	<i>0.23 ±0.02</i>
20:4n-6	1.99 ±0.15		<i>1.94 ±0.14</i>	<i>2.25 ±0.11</i>	<i>1.29 ±0.27</i>	<i>1.75 ±0.10</i>	1.51 ±0.10	1.65 ±0.09	<i>1.19 ±0.08</i>	<i>1.63 ±0.14</i>
22:4n-6	0.22 ±0.02		<i>0.21 ±0.02</i>	<i>0.25 ±0.01</i>	<i>0.14 ±0.02</i>	<i>0.21 ±0.00</i>	0.16 ±0.00	0.18 ±0.01	<i>0.11 ±0.02</i>	<i>0.17 ±0.02</i>
22:5n-6	0.25 ±0.03		0.28 ±0.03	0.29 ±0.03	<i>0.20 ±0.07</i>	<i>0.26 ±0.00</i>	0.24 ±0.01	0.25 ±0.02	0.20 ±0.02	0.26 ±0.06
Total n-6 PUFA	5.81 ±0.26		<i>11.24 ±0.75</i>	<i>5.97 ±0.54</i>	<i>11.96 ±2.18</i>	<i>4.75 ±0.28</i>	<i>9.95 ±0.43</i>	<i>5.17 ±1.51</i>	<i>10.11 ±0.38</i>	<i>4.07 ±0.13</i>
18:3n-3	0.60 ±0.07		<i>1.37 ±0.20</i>	<i>0.53 ±0.11</i>	<i>1.50 ±0.26</i>	<i>0.51 ±0.02</i>	<i>1.22 ±0.01</i>	<i>0.66 ±0.13</i>	<i>1.23 ±0.04</i>	<i>0.54 ±0.06</i>
18:4n-3	0.89 ±0.05		0.90 ±0.04	1.02 ±0.06	<i>0.78 ±0.11</i>	<i>1.13 ±0.05</i>	<i>0.96 ±0.03</i>	<i>1.14 ±0.09</i>	<i>0.88 ±0.08</i>	<i>1.19 ±0.14</i>
20:3n-3	0.09 ±0.01		0.12 ±0.01	0.09 ±0.00	0.12 ±0.03	0.09 ±0.00	<i>0.11 ±0.01</i>	<i>0.06 ±0.05</i>	0.10 ±0.01	0.09 ±0.01
20:4n-3	0.31 ±0.02		<i>0.41 ±0.02</i>	<i>0.34 ±0.01</i>	0.38 ±0.08	0.35 ±0.01	<i>0.41 ±0.02</i>	<i>0.35 ±0.03</i>	0.39 ±0.03	0.34 ±0.02
20:5n-3	6.93 ±0.45		7.95 ±0.32	8.09 ±0.36	6.53 ±1.59	7.18 ±0.44	7.13 ±0.28	6.93 ±0.55	6.52 ±0.48	6.49 ±0.33
22:5n-3	2.06 ±0.16		2.48 ±0.15	2.24 ±0.08	1.96 ±0.59	1.98 ±0.02	2.23 ±0.11	1.89 ±0.25	2.05 ±0.07	1.92 ±0.22
22:6n-3	7.20 ±0.62		<i>7.38 ±0.38</i>	<i>8.96 ±0.57</i>	<i>5.70 ±1.54</i>	<i>9.18 ±0.27</i>	<i>7.59 ±0.39</i>	<i>8.91 ±0.39</i>	<i>7.09 ±0.63</i>	<i>9.29 ±1.02</i>
Total n-3 PUFA	18.07 ±1.31		20.62 ±0.88	21.28 ±0.28	<i>16.96 ±4.21</i>	<i>20.43 ±0.67</i>	19.64 ±0.64	19.93 ±1.28	18.27 ±1.32	19.86 ±1.79
Total PUFA	24.78 ±1.52		<i>33.23 ±1.42</i>	<i>28.07 ±0.91</i>	<i>30.37 ±6.53</i>	<i>25.74 ±0.51</i>	<i>30.81 ±1.11</i>	<i>25.74 ±2.82</i>	<i>29.60 ±1.75</i>	<i>24.42 ±1.95</i>
16;2	0.27 ±0.03		<i>0.38 ±0.02</i>	<i>0.25 ±0.10</i>	<i>0.39 ±0.03</i>	<i>0.17 ±0.05</i>	<i>0.35 ±0.01</i>	<i>0.18 ±0.03</i>	<i>0.33 ±0.02</i>	<i>0.14 ±0.01</i>
16;3	0.27 ±0.06		<i>0.36 ±0.02</i>	<i>0.22 ±0.08</i>	<i>0.43 ±0.06</i>	<i>0.12 ±0.06</i>	<i>0.35 ±0.06</i>	<i>0.13 ±0.07</i>	<i>0.35 ±0.02</i>	<i>0.06 ±0.01</i>
16;4	0.36 ±0.03		<i>0.62 ±0.04</i>	<i>0.36 ±0.03</i>	<i>0.64 ±0.05</i>	<i>0.26 ±0.01</i>	<i>0.52 ±0.02</i>	<i>0.33 ±0.06</i>	<i>0.55 ±0.02</i>	<i>0.29 ±0.05</i>
Total	0.89 ±0.08		<i>1.37 ±0.08</i>	<i>0.82 ±0.21</i>	<i>1.46 ±0.14</i>	<i>0.56 ±0.10</i>	<i>1.22 ±0.09</i>	<i>0.64 ±0.16</i>	<i>1.22 ±0.05</i>	<i>0.49 ±0.04</i>
n-3/n-6	3.10 ±0.18		<i>1.85 ±0.11</i>	<i>3.58 ±0.30</i>	<i>1.40 ±0.07</i>	<i>4.31 ±0.36</i>	<i>1.97 ±0.05</i>	<i>4.02 ±0.86</i>	<i>1.81 ±0.07</i>	<i>4.87 ±0.28</i>
Σ(18:2n6; 18:3n3)	3.26 ±0.25		<i>9.34 ±0.81</i>	<i>2.97 ±0.60</i>	<i>10.87 ±1.45</i>	<i>2.43 ±0.32</i>	<i>8.48 ±0.53</i>	<i>3.12 ±1.49</i>	<i>9.11 ±0.25</i>	<i>1.91 ±0.06</i>
Total Lipid	4.51 ±0.49		3.18 ±0.29	3.68 ±0.67	4.23 ±0.58	5.26 ±0.93	2.12 ±0.33	2.35 ±0.20	2.16 ±0.10	1.89 ±0.26

Table S2. Liver fatty acid profile. Significant differences between diets are represented in red italics.

	0 days	30 days		60 days		90 days		120 days	
	Control	CD group	Control group	CD group	Control group	CD group	Control group	CD group	Control group
14:0	4.85 ±0.29	2.99 ±0.29	4.63 ±0.26	3.94 ±0.74	5.57 ±0.10	4.07 ±0.12	5.87 ±0.90	3.58 ±0.45	4.37 ±0.86
15:0	0.16 ±0.01	0.19 ±0.00	0.16 ±0.00	0.13 ±0.02	0.15 ±0.02	0.21 ±0.00	0.19 ±0.01	0.27 ±0.02	0.31 ±0.03
16:0	26.76 ±0.63	20.09 ±0.55	25.72 ±0.47	22.62 ±1.91	24.35 ±0.25	24.58 ±0.79	23.24 ±1.01	24.45 ±2.06	25.36 ±0.50
18:0	3.33 ±0.33	3.53 ±1.59	2.77 ±0.27	3.13 ±0.25	2.14 ±0.06	2.87 ±0.49	2.22 ±0.12	2.95 ±0.28	3.80 ±0.48
20:0	0.11 ±0.01	0.15 ±0.03	0.09 ±0.01	0.10 ±0.00	0.08 ±0.01	0.12 ±0.01	0.09 ±0.00	0.13 ±0.00	0.19 ±0.03
22:0	0.08 ±0.04	0.08 ±0.04	0.06 ±0.03	0.09 ±0.01	0.00 ±0.00	0.07 ±0.04	0.09 ±0.01	0.07 ±0.03	0.08 ±0.04
Total saturated	35.29 ±0.80	27.02 ±0.79	33.44 ±0.90	30.00 ±2.45	32.29 ±0.26	31.92 ±1.15	31.70 ±1.86	31.45 ±2.61	34.11 ±0.18
16:1n-9	0.47 ±0.02	0.59 ±0.01	0.51 ±0.01	0.58 ±0.01	0.55 ±0.05	0.54 ±0.06	0.71 ±0.08	0.54 ±0.05	0.69 ±0.11
16:1n-7	11.41 ±0.93	7.29 ±1.15	14.31 ±0.71	10.40 ±1.74	15.65 ±0.49	11.46 ±1.08	15.80 ±1.98	10.44 ±1.10	11.74 ±2.27
18:1n-9	25.85 ±0.33	24.66 ±2.29	25.86 ±0.65	28.95 ±0.55	28.45 ±1.13	24.80 ±1.09	29.95 ±2.68	23.96 ±0.67	22.66 ±1.23
18:1n-7	5.86 ±0.17	5.94 ±0.22	6.08 ±0.12	6.05 ±0.13	5.80 ±0.10	5.63 ±0.12	5.50 ±0.28	5.23 ±0.28	5.29 ±0.30
20:1n-11	0.63 ±0.03	0.26 ±0.02	0.61 ±0.06	0.18 ±0.01	0.63 ±0.03	0.71 ±0.04	0.71 ±0.04	0.73 ±0.05	1.27 ±0.35
20:1n-9	2.13 ±0.10	1.58 ±0.07	1.90 ±0.22	1.03 ±0.18	2.08 ±0.09	2.21 ±0.39	2.31 ±0.17	2.97 ±0.18	3.51 ±0.45
20:1n-7	0.62 ±0.04	0.50 ±0.02	0.47 ±0.08	0.38 ±0.09	0.45 ±0.02	0.51 ±0.01	0.46 ±0.06	0.53 ±0.07	0.52 ±0.04
22:1n-11	1.28 ±0.07	0.46 ±0.05	1.23 ±0.11	0.35 ±0.03	1.35 ±0.03	1.52 ±0.06	1.36 ±0.04	1.73 ±0.03	1.94 ±0.04
22:1n-9	0.25 ±0.02	0.14 ±0.02	0.22 ±0.02	0.13 ±0.02	0.24 ±0.01	0.24 ±0.00	0.25 ±0.01	0.25 ±0.01	0.31 ±0.03
24:1n-9	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00
Total monounsaturated	48.49 ±1.34	41.42 ±3.57	51.19 ±1.69	48.05 ±1.95	55.20 ±0.86	47.64 ±0.72	57.04 ±1.18	46.39 ±1.50	47.93 ±3.36
18:2n-6	0.70 ±0.03	9.31 ±0.46	0.63 ±0.08	6.73 ±1.10	0.48 ±0.04	2.62 ±0.27	0.54 ±0.01	3.41 ±0.66	0.81 ±0.06
18:3n-6	0.06 ±0.00	0.25 ±0.04	0.05 ±0.01	0.27 ±0.05	0.05 ±0.00	0.12 ±0.01	0.05 ±0.00	0.12 ±0.01	0.05 ±0.01
20:2n-6	0.19 ±0.02	0.64 ±0.10	0.23 ±0.05	0.39 ±0.11	0.14 ±0.02	0.30 ±0.02	0.13 ±0.02	0.37 ±0.07	0.24 ±0.04
20:3n-6	0.13 ±0.01	0.18 ±0.01	0.10 ±0.03	0.13 ±0.03	0.09 ±0.02	0.17 ±0.01	0.06 ±0.01	0.21 ±0.02	0.15 ±0.05
20:4n-6	1.87 ±0.20	1.87 ±0.45	1.65 ±0.17	1.00 ±0.20	1.25 ±0.11	1.54 ±0.15	1.12 ±0.13	1.53 ±0.16	1.86 ±0.22
22:4n-6	0.14 ±0.01	0.06 ±0.03	0.14 ±0.02	0.03 ±0.03	0.11 ±0.01	0.11 ±0.01	0.08 ±0.02	0.12 ±0.02	0.12 ±0.03
22:5n-6	0.21 ±0.02	0.15 ±0.08	0.19 ±0.02	0.14 ±0.03	0.15 ±0.01	0.18 ±0.00	0.11 ±0.02	0.17 ±0.02	0.15 ±0.03
Total n-6 PUFA	3.30 ±0.27	12.46 ±0.94	2.99 ±0.20	8.68 ±1.46	2.27 ±0.18	5.03 ±0.28	2.09 ±0.16	5.93 ±0.86	3.39 ±0.40
18:3n-3	0.18 ±0.01	1.12 ±0.09	0.17 ±0.02	0.78 ±0.15	0.16 ±0.02	0.45 ±0.04	0.17 ±0.00	0.59 ±0.12	0.27 ±0.02
18:4n-3	0.34 ±0.03	0.45 ±0.05	0.36 ±0.02	0.35 ±0.05	0.35 ±0.03	0.50 ±0.03	0.39 ±0.02	0.55 ±0.02	0.43 ±0.07
20:3n-3	0.03 ±0.01	0.15 ±0.03	0.03 ±0.01	0.09 ±0.02	0.03 ±0.01	0.07 ±0.01	0.01 ±0.01	0.10 ±0.02	0.05 ±0.02
20:4n-3	0.24 ±0.01	0.32 ±0.02	0.23 ±0.02	0.25 ±0.07	0.22 ±0.01	0.32 ±0.04	0.16 ±0.04	0.37 ±0.06	0.27 ±0.09
20:5n-3	4.43 ±0.45	6.47 ±0.66	4.18 ±0.39	4.75 ±0.87	3.29 ±0.29	4.76 ±0.14	2.75 ±0.24	5.14 ±0.48	3.95 ±0.72
22:5n-3	1.07 ±0.05	1.73 ±0.26	0.97 ±0.11	1.24 ±0.35	0.90 ±0.06	1.56 ±0.23	0.73 ±0.16	1.84 ±0.34	1.47 ±0.58
22:6n-3	6.18 ±0.53	8.36 ±1.36	6.07 ±0.43	5.36 ±1.41	4.88 ±0.43	7.25 ±0.20	4.45 ±0.51	7.30 ±0.94	7.50 ±1.80
Total n-3 PUFA	12.47 ±1.04	18.61 ±2.22	12.02 ±0.80	12.83 ±2.87	9.83 ±0.85	14.91 ±0.29	8.66 ±0.87	15.90 ±1.93	13.94 ±3.13
Total PUFA	16.21 ±1.37	31.55 ±2.88	15.37 ±1.18	21.95 ±4.32	12.52 ±0.89	20.44 ±0.52	11.26 ±0.85	22.16 ±2.78	17.96 ±3.29
16;2	0.07 ±0.02	0.14 ±0.01	0.04 ±0.03	0.10 ±0.01	0.09 ±0.04	0.08 ±0.02	0.07 ±0.05	0.10 ±0.01	0.07 ±0.04
16;3	0.28 ±0.08	0.16 ±0.03	0.27 ±0.14	0.18 ±0.02	0.30 ±0.15	0.29 ±0.16	0.41 ±0.20	0.11 ±0.03	0.50 ±0.26
16;4	0.09 ±0.01	0.19 ±0.01	0.05 ±0.02	0.16 ±0.02	0.04 ±0.02	0.12 ±0.02	0.04 ±0.02	0.13 ±0.02	0.06 ±0.03
Total	0.44 ±0.09	0.49 ±0.05	0.36 ±0.18	0.44 ±0.05	0.42 ±0.21	0.50 ±0.14	0.52 ±0.27	0.34 ±0.05	0.63 ±0.32
n-3/n-6	3.78 ±0.12	1.49 ±0.14	4.02 ±0.02	1.45 ±0.15	4.33 ±0.06	2.97 ±0.11	4.14 ±0.12	2.70 ±0.15	4.00 ±0.51
Σ(18:2n6; 18:3n3)	0.88 ±0.04	10.42 ±0.55	0.80 ±0.10	7.51 ±1.25	0.64 ±0.06	3.07 ±0.31	0.71 ±0.01	4.00 ±0.78	1.08 ±0.08
Total Lipid	6.98 ±1.56	7.45 ±1.77	10.70 ±1.55	13.78 ±2.10	13.86 ±1.31	12.68 ±2.77	14.95 ±2.23	11.09 ±0.97	8.60 ±1.11

Table S3. Brain fatty acid profile. Significant differences between diets are represented in red italics.

	0 days	30 days		60 days		90 days		120 days	
	Control	CD group	Control group	CD group	Control group	CD group	Control group	CD group	Control group
14:0	1.87 ±0.16	2.06 ±0.43	2.20 ±0.16	2.17 ±0.22	1.87 ±0.22	2.28 ±0.19	2.23 ±0.11	2.96 ±0.24	2.50 ±0.36
15:0	0.25 ±0.01	0.24 ±0.02	0.27 ±0.03	0.25 ±0.02	0.21 ±0.01	0.25 ±0.03	0.23 ±0.01	0.32 ±0.01	0.28 ±0.03
16:0	20.79 ±0.42	19.63 ±0.32	21.04 ±0.32	20.09 ±0.25	20.85 ±0.37	21.20 ±0.28	20.37 ±0.12	22.01 ±0.56	21.78 ±0.66
18:0	8.95 ±0.38	8.27 ±0.92	8.06 ±0.52	7.95 ±0.53	8.84 ±0.76	8.23 ±0.26	8.18 ±0.29	7.40 ±0.36	8.51 ±0.81
20:0	0.19 ±0.01	0.15 ±0.01	0.16 ±0.01	0.14 ±0.00	0.15 ±0.01	0.17 ±0.01	0.14 ±0.01	0.16 ±0.01	0.16 ±0.01
22:0	0.44 ±0.06	0.27 ±0.02	0.35 ±0.05	0.26 ±0.01	0.27 ±0.14	0.30 ±0.02	0.29 ±0.01	0.27 ±0.01	0.30 ±0.03
Total saturated	32.50 ±0.70	30.61 ±0.19	32.07 ±0.70	30.87 ±0.10	32.19 ±1.00	32.43 ±0.29	31.44 ±0.24	33.11 ±0.53	33.52 ±0.21
16:1n-9	0.45 ±0.02	0.42 ±0.01	0.43 ±0.00	0.42 ±0.01	0.45 ±0.01	0.46 ±0.03	0.43 ±0.01	0.44 ±0.01	0.39 ±0.02
16:1n-7	5.80 ±0.45	5.57 ±0.74	6.47 ±0.48	6.03 ±0.76	5.28 ±0.58	6.47 ±0.48	6.12 ±0.32	7.82 ±0.81	6.09 ±0.83
18:1n-9	19.13 ±0.41	18.85 ±0.11	18.74 ±0.46	18.85 ±0.21	19.16 ±0.40	20.35 ±0.59	18.87 ±0.04	20.38 ±0.39	19.86 ±0.74
18:1n-7	3.70 ±0.15	3.50 ±0.29	3.83 ±0.07	3.65 ±0.22	3.55 ±0.08	3.79 ±0.14	3.38 ±0.13	4.10 ±0.25	3.36 ±0.39
20:1n-11	0.10 ±0.01	0.12 ±0.03	0.16 ±0.00	0.12 ±0.02	0.14 ±0.01	0.14 ±0.01	0.18 ±0.01	0.18 ±0.03	0.29 ±0.05
20:1n-9	0.88 ±0.07	1.05 ±0.18	1.15 ±0.02	0.98 ±0.12	1.03 ±0.06	1.12 ±0.12	1.35 ±0.07	1.30 ±0.16	1.82 ±0.14
20:1n-7	0.37 ±0.01	0.37 ±0.02	0.36 ±0.02	0.33 ±0.01	0.35 ±0.01	0.37 ±0.01	0.34 ±0.02	0.37 ±0.01	0.36 ±0.01
22:1n-11	0.24 ±0.04	0.33 ±0.09	0.38 ±0.01	0.27 ±0.06	0.31 ±0.03	0.33 ±0.04	0.47 ±0.03	0.39 ±0.07	0.80 ±0.11
22:1n-9	0.12 ±0.00	0.13 ±0.01	0.14 ±0.01	0.10 ±0.01	0.12 ±0.00	0.13 ±0.00	0.14 ±0.01	0.14 ±0.02	0.18 ±0.02
24:1n-9	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00
Total monounsaturated	30.78 ±0.86	30.33 ±1.45	31.64 ±0.27	30.77 ±1.04	30.40 ±0.27	33.15 ±1.27	31.27 ±0.47	35.11 ±1.45	33.14 ±1.58
18:2n-6	2.46 ±0.30	3.69 ±0.75	2.57 ±0.43	4.51 ±0.49	1.82 ±0.14	3.77 ±0.22	1.69 ±0.21	4.82 ±0.75	1.43 ±0.34
18:3n-6	0.18 ±0.01	0.18 ±0.01	0.17 ±0.03	0.20 ±0.03	0.12 ±0.01	0.17 ±0.01	0.14 ±0.01	0.32 ±0.13	0.11 ±0.01
20:2n-6	0.18 ±0.03	0.19 ±0.03	0.16 ±0.01	0.19 ±0.01	0.12 ±0.01	0.18 ±0.01	0.08 ±0.04	0.41 ±0.20	0.11 ±0.06
20:3n-6	0.12 ±0.01	0.13 ±0.01	0.12 ±0.01	0.12 ±0.00	0.10 ±0.01	0.11 ±0.01	0.11 ±0.01	0.10 ±0.02	0.08 ±0.04
20:4n-6	3.83 ±0.18	3.42 ±0.32	3.63 ±0.07	3.10 ±0.20	3.82 ±0.03	2.83 ±0.30	3.46 ±0.05	2.25 ±0.27	3.02 ±0.24
22:4n-6	0.14 ±0.01	0.12 ±0.01	0.14 ±0.00	0.11 ±0.00	0.13 ±0.01	0.10 ±0.01	0.13 ±0.01	0.24 ±0.15	0.08 ±0.04
22:5n-6	0.11 ±0.01	0.12 ±0.02	0.12 ±0.00	0.11 ±0.00	0.12 ±0.01	0.10 ±0.01	0.12 ±0.01	0.10 ±0.00	0.07 ±0.04
Total n-6 PUFA	7.01 ±0.26	7.85 ±0.51	6.91 ±0.40	8.34 ±0.48	6.23 ±0.13	7.25 ±0.16	5.73 ±0.22	8.25 ±0.63	4.90 ±0.20
18:3n-3	0.30 ±0.04	0.60 ±0.05	0.33 ±0.05	0.60 ±0.05	0.25 ±0.03	0.56 ±0.05	0.31 ±0.05	0.69 ±0.14	0.28 ±0.02
18:4n-3	0.30 ±0.04	0.47 ±0.07	0.44 ±0.06	0.44 ±0.04	0.35 ±0.06	0.42 ±0.04	0.50 ±0.05	0.50 ±0.02	0.54 ±0.05
20:3n-3	0.03 ±0.01	0.04 ±0.02	0.01 ±0.01	0.05 ±0.00	0.02 ±0.01	0.04 ±0.00	0.00 ±0.00	0.04 ±0.02	0.01 ±0.01
20:4n-3	0.12 ±0.01	0.18 ±0.02	0.15 ±0.01	0.18 ±0.01	0.13 ±0.02	0.17 ±0.01	0.15 ±0.01	0.19 ±0.02	0.17 ±0.02
20:5n-3	4.41 ±0.17	5.12 ±0.34	4.90 ±0.35	4.96 ±0.26	4.54 ±0.35	4.32 ±0.04	4.65 ±0.11	4.31 ±0.23	4.13 ±0.09
22:5n-3	4.41 ±0.05	5.12 ±0.07	4.90 ±0.09	4.96 ±0.03	4.54 ±0.09	4.32 ±0.01	4.65 ±0.06	4.31 ±0.05	4.13 ±0.17
22:6n-3	19.20 ±1.08	19.26 ±1.71	18.35 ±0.22	18.77 ±1.53	20.70 ±0.35	16.36 ±1.51	20.81 ±0.51	13.00 ±1.79	18.26 ±1.63
Total n-3 PUFA	25.42 ±1.12	26.93 ±1.17	25.30 ±0.48	26.20 ±1.15	27.00 ±0.89	22.87 ±1.42	27.46 ±0.39	19.79 ±1.96	24.54 ±1.63
Total PUFA	36.73 ±1.18	39.06 ±1.27	36.29 ±0.60	38.36 ±1.00	37.41 ±0.75	34.42 ±1.55	37.29 ±0.41	31.77 ±1.87	33.34 ±1.79
16;2	0.29 ±0.04	0.29 ±0.03	0.29 ±0.06	0.31 ±0.05	0.18 ±0.04	0.30 ±0.04	0.20 ±0.04	0.39 ±0.07	0.16 ±0.02
16;3	0.23 ±0.05	0.25 ±0.02	0.23 ±0.06	0.26 ±0.04	0.12 ±0.04	0.26 ±0.04	0.17 ±0.08	0.33 ±0.08	0.12 ±0.01
16;4	3.78 ±0.25	3.74 ±0.60	3.55 ±0.28	3.25 ±0.31	3.88 ±0.31	3.74 ±0.16	3.72 ±0.20	3.02 ±0.09	3.61 ±0.51
Total	4.29 ±0.25	4.27 ±0.57	4.07 ±0.16	3.83 ±0.24	4.17 ±0.25	4.30 ±0.07	4.10 ±0.27	3.74 ±0.13	3.89 ±0.52
n-3/n-6	3.65 ±0.22	3.47 ±0.34	3.68 ±0.20	3.18 ±0.32	4.33 ±0.09	3.15 ±0.19	4.81 ±0.24	2.45 ±0.39	5.04 ±0.47
Σ(18:2n6; 18:3n3)	2.75 ±0.33	4.28 ±0.80	2.90 ±0.48	5.11 ±0.54	2.07 ±0.17	4.33 ±0.28	2.00 ±0.20	5.52 ±0.89	1.70 ±0.35
Total Lipid	8.01 ±1.74	6.75 ±1.78	8.27 ±1.86	7.80 ±0.93	4.15 ±1.37	5.39 ±2.53	7.89 ±1.89	8.37 ±0.73	6.90 ±2.28

Table S4. Pearson correlations between lipid classes and fatty acids. Only significant results are shown. Correlations degrees higher than 0.700 are remarked in both bold and blue color.

	SM	PC	PS	PI	PA/PG/CL	PE	Total PL	CHOL	FFA	TAG
14:0		-0.763		-0.741		-0.842	-0.827			0.566
15:0	-0.367							-0.621	-0.346	0.671
16:0	0.282	-0.513		-0.584		-0.606	-0.576	0.307		
18:0		0.846	0.312	0.733		0.945	0.929		-0.288	-0.606
20:0	-0.291	0.321	0.300	0.326			0.271	-0.541	-0.398	0.393
22:0		0.475	0.338	0.424		0.633	0.579			
16:1n-9		-0.433		-0.497		-0.414	-0.432		0.573	
16:1n-7		-0.804		-0.828		-0.816	-0.825		0.412	0.326
18:1n-9	0.333	-0.692	-0.360	-0.679	-0.376	-0.665	-0.683	0.321	0.518	
18:1n-7	0.339	-0.772	-0.287	-0.783		-0.813	-0.808		0.439	
20:1n-11	0.334	-0.445	-0.311	-0.474		-0.443	-0.442		0.566	
20:1n-9	-0.013	-0.482		-0.326		-0.667	-0.605			0.620
20:1n-7	0.334	-0.407		-0.442		-0.547	-0.498	0.320		
22:1n-11	0.092	-0.560		-0.461		-0.731	-0.676			0.514
22:1n-9	0.192	-0.488	-0.279	-0.473		-0.613	-0.578			0.321
24:1n-9										
18:2n-6	-0.303							-0.437		0.338
18:3n-6	-0.305					0.316		-0.325		
20:2n-6	-0.164	-0.397				-0.430	-0.447	-0.292		0.525
20:3n-6	-0.055					-0.358	-0.281			0.428
20:4n-6	-0.030	0.860		0.718	0.300	0.899	0.898		-0.346	-0.543
22:4n-6	-0.096								-0.336	
22:5n-6	0.052	-0.271				-0.477	-0.399			0.460
18:3n-3	-0.326							-0.552		0.603
18:4n-3	-0.396					-0.362	-0.338	-0.548	-0.303	0.860
20:3n-3	-0.145	-0.327				-0.424	-0.374	-0.451		0.537
20:4n-3	-0.088	-0.550		-0.324		-0.700	-0.653			0.655
20:5n-3	-0.291				0.286			-0.370	-0.310	0.622
22:5n-3	-0.233					-0.374	-0.331	-0.412		0.636
22:6n-3	-0.197	0.846		0.798		0.902	0.892		-0.361	-0.440
16:2	-0.329	0.369	0.389	0.307	0.310	0.434	0.410	-0.385	-0.401	
16:3	0.159									
16:4	-0.253	0.832	0.355	0.741		0.949	0.917		-0.395	-0.376

Supplementary material: Chapter 3

Table S5. Correlation coefficient between the fatty acids and the immune parameters. Only significant results are represented ($p \leq 0.05$). Asterisks denote significant differences with $p \leq 0.01$.

Fatty acids	Innate immune parameters				
	Serum peroxidase	Leucocyte peroxidase	Respiratory burst	Phagocytic ability	Phagocytic capacity
14:0		0.334			
15:0					
16:0		0.331			
18:0		-0.358	0.371		
20:0					
22:0					
Total saturated			0.388		-0.344
16:1n-7		0.364			
18:1n-9					
18:1n-7					-0.484*
20:1n-9					
22:1n-9					
24:1n-9		-0.356	0.378		-0.383
Total monounsaturated		0.428*			
18:2n-6 (LA)			-0.447*		0.350
18:3n-6					0.396
20:2n-6					
20:3n-6		-0.330	0.376		
20:4n-6 (ARA)		-0.366	0.403		
22:2n-6			-0.378		0.363
22:4n-6		-0.337	0.357		
Total n-6 PUFA			-0.380		
18:3n-3 (LNA)			-0.478*		0.408
18:4n-3					
20:3n-3			-0.403		
20:5n-3 (EPA)					
22:5n-3					
22:6n-3 (DHA)					
Total n-3 PUFA		-0.340			
Total PUFA		-0.409			
n3/n6			0.353		
Total Lipid		0.592*			

Supplementary material: Chapter 4

Table S6. Total fatty acid profile of *S. aurita*. Significant differences are shown in red.

FLESH	Group A	Group B	Group C	BRAIN	Group A	Group B	Group C
14:0	4.46 ± 0.91 a	2.56 ± 2.01 ab	1.27 ± 0.85 b	14:0	0.99 ± 0.84 a	0.37 ± 0.72 b	0.23 ± 0.22 b
15:0	0.43 ± 0.12 a	0.65 ± 0.24 b	0.75 ± 0.17 b	15:0	0.11 ± 0.16	0.08 ± 0.09	0.17 ± 0.10
16:0	20.46 ± 1.61 a	24.37 ± 1.78 b	28.04 ± 2.92 c	16:0	17.42 ± 2.83	13.96 ± 5.57	15.10 ± 4.49
18:0	4.71 ± 0.64 a	6.21 ± 0.81 b	6.68 ± 0.76 b	18:0	9.10 ± 1.78	9.39 ± 1.16	10.22 ± 0.85
20:0	0.34 ± 0.04	0.32 ± 0.16	0.20 ± 0.11	20:0	0.54 ± 0.17	0.57 ± 0.17	0.49 ± 0.15
22:0	0.22 ± 0.04	0.20 ± 0.10	0.14 ± 0.06	22:0	0.67 ± 0.26	0.78 ± 0.20	0.66 ± 0.20
Total saturated	30.62 ± 2.76 a	34.31 ± 3.35 a	37.08 ± 3.81 b	Total saturated	28.83 ± 3.50	25.14 ± 5.26	26.87 ± 4.57
16:1n-7	4.59 ± 1.18 a	2.16 ± 1.66 b	0.94 ± 0.44 b	16:1n-7	4.73 ± 1.38	4.78 ± 1.14	5.35 ± 0.60
18:1n-9	22.08 ± 1.53 a	8.84 ± 7.23 b	4.34 ± 1.47 b	18:1n-9	34.97 ± 7.32	35.07 ± 3.98	35.34 ± 2.33
18:1n-7	3.60 ± 0.47 a	1.97 ± 1.10 b	1.43 ± 0.30 b	18:1n-7	2.13 ± 0.46	2.62 ± 2.18	2.68 ± 2.33
20:1n-9	1.28 ± 0.21 a	0.78 ± 0.57 ab	0.32 ± 0.11 b	20:1n-9	0.68 ± 0.30	0.53 ± 0.32	0.50 ± 0.17
22:1n-9	0.20 ± 0.05	0.18 ± 0.10	0.10 ± 0.06	22:1n-9	0.20 ± 0.17	0.06 ± 0.12	0.13 ± 0.14
24:1n-9	0.29 ± 0.08 a	0.41 ± 0.10 b	0.38 ± 0.08 b	24:1n-9	5.23 ± 2.06	5.67 ± 1.27	6.25 ± 1.42
Total monounsaturated	32.04 ± 2.69 a	14.34 ± 10.36 b	7.50 ± 2.27 b	Total monounsaturated	47.94 ± 9.78	48.72 ± 4.58	50.26 ± 3.54
18:2n-6	16.58 ± 5.06 a	5.52 ± 6.29 b	1.86 ± 0.60 b	18:2n-6	2.79 ± 1.96 a	1.16 ± 1.36 ab	0.20 ± 0.16 b
18:3n-6	0.42 ± 0.17 a	0.16 ± 0.11 b	0.09 ± 0.05 b	18:3n-6	0.02 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.07
20:2n-6	0.34 ± 0.07	0.28 ± 0.14	0.21 ± 0.02	20:2n-6	0.06 ± 0.13	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
20:3n-6	0.30 ± 0.11 a	0.20 ± 0.07 a	0.13 ± 0.03 b	20:3n-6	0.09 ± 0.13	0.09 ± 0.14	0.08 ± 0.20
20:4n-6	0.62 ± 0.11 a	1.50 ± 0.50 b	1.71 ± 0.28 b	20:4n-6	2.59 ± 0.50	2.96 ± 0.40	2.62 ± 0.86
22:2n-6	0.45 ± 0.08 a	0.32 ± 0.09 b	0.23 ± 0.07 b	22:2n-6	0.39 ± 0.16	0.67 ± 1.05	0.54 ± 0.86
22:4n-6	0.22 ± 0.07	0.38 ± 0.22	0.33 ± 0.12	22:4n-6	0.40 ± 0.16	0.48 ± 0.18	0.80 ± 1.44
Total n-6 PUFA	18.93 ± 5.22 a	8.36 ± 5.98 b	4.56 ± 0.42 b	Total n-6 PUFA	6.33 ± 2.01 a	5.36 ± 1.60 ab	4.27 ± 1.41 b
18:3n-3	2.11 ± 0.30 a	1.78 ± 1.73 ab	0.92 ± 0.92 b	18:3n-3	0.41 ± 0.44	1.07 ± 1.91	0.69 ± 1.68
18:4n-3	0.89 ± 0.21 a	0.58 ± 0.31 ab	0.35 ± 0.26 b	18:4n-3	0.17 ± 0.17	0.10 ± 0.15	0.02 ± 0.08
20:3n-3	0.10 ± 0.07	0.10 ± 0.08	0.09 ± 0.06	20:3n-3	0.01 ± 0.04 a	0.00 ± 0.00 a	0.06 ± 0.09 b
20:5n-3	5.82 ± 1.57	5.41 ± 1.22	4.64 ± 0.95	20:5n-3	2.31 ± 1.41	2.25 ± 0.83	1.77 ± 1.01
22:5n-3	0.91 ± 0.17 a	0.64 ± 0.21 b	0.50 ± 0.07 b	22:5n-3	0.64 ± 0.49	0.44 ± 0.22	0.37 ± 0.18
22:6n-3	8.58 ± 2.62 a	34.49 ± 16.40 b	44.35 ± 5.51 b	22:6n-3	13.35 ± 4.69	16.91 ± 3.92	15.70 ± 5.41
Total n-3 PUFA	18.41 ± 3.92 a	43.00 ± 15.94 b	50.85 ± 5.49 b	Total n-3 PUFA	16.90 ± 6.36	20.77 ± 5.25	18.60 ± 5.16
Total PUFA	37.34 ± 4.96 a	51.36 ± 11.06 b	55.41 ± 5.30 b	Total PUFA	23.23 ± 7.90	26.13 ± 6.01	22.87 ± 5.56

LIVER	Group A	Group B	Group C	GONAD	Group A	Group B	Group C
14:0	2.68 ± 0.88	3.15 ± 2.12	2.19 ± 0.62	14:0	4.69 ± 0.97	5.79 ± 3.36	4.70 ± 2.53
15:0	0.26 ± 0.15 a	1.27 ± 0.47 b	1.39 ± 0.26 b	15:0	0.46 ± 0.12 a	1.48 ± 0.47 b	1.76 ± 0.73 b
16:0	28.04 ± 4.53 a	35.21 ± 4.93 b	36.19 ± 5.06 b	16:0	21.27 ± 1.20 a	31.93 ± 3.85 b	35.18 ± 8.98 b
18:0	5.66 ± 1.08 a	11.04 ± 3.70 b	10.32 ± 2.59 b	18:0	4.80 ± 0.44 a	8.81 ± 2.42 b	12.77 ± 2.44 c
20:0	0.16 ± 0.12 a	0.50 ± 0.16 b	0.55 ± 0.23 b	20:0	0.30 ± 0.03 a	0.66 ± 0.25 b	0.79 ± 0.36 b
22:0	0.06 ± 0.09	0.25 ± 0.18	0.17 ± 0.17	22:0	0.13 ± 0.10 a	0.33 ± 0.23 ab	0.52 ± 0.05 b
Total saturated	36.87 ± 3.96 a	51.41 ± 8.04 b	50.82 ± 6.38 b	Total saturated	31.65 ± 2.23 a	49.00 ± 6.58 b	55.72 ± 13.32 b
16:1n-7	3.07 ± 1.00 a	2.10 ± 1.19 ab	1.33 ± 0.77 b	16:1n-7	4.62 ± 1.08 a	3.86 ± 1.23 a	2.19 ± 0.58 b
18:1n-9	27.11 ± 5.66 a	11.43 ± 6.40 b	9.51 ± 4.23 b	18:1n-9	21.25 ± 2.05 a	10.51 ± 2.55 b	9.20 ± 1.58 b
18:1n-7	3.95 ± 0.79 a	3.15 ± 0.92 ab	2.79 ± 0.61 b	18:1n-7	3.81 ± 0.47 a	2.91 ± 0.76 b	2.99 ± 0.67 b
20:1n-9	1.34 ± 0.15	1.18 ± 0.58	1.36 ± 1.41	20:1n-9	1.16 ± 0.12	1.20 ± 0.45	1.16 ± 0.85
22:1n-9	0.05 ± 0.08	0.13 ± 0.18	0.12 ± 0.20	22:1n-9	0.11 ± 0.08	0.18 ± 0.18	0.15 ± 0.17
24:1n-9	0.21 ± 0.09 a	0.85 ± 0.36 b	0.84 ± 0.25 b	24:1n-9	0.27 ± 0.06 a	0.95 ± 0.30 b	1.39 ± 0.35 c
Total monounsaturated	35.72 ± 4.70 a	18.85 ± 8.09 b	15.95 ± 5.78 b	Total monounsaturated	31.22 ± 3.26 a	19.60 ± 2.89 b	17.08 ± 2.05 b
18:2n-6	8.23 ± 3.57 a	2.94 ± 2.36 b	1.81 ± 0.36 b	18:2n-6	14.63 ± 4.34 a	2.92 ± 1.33 b	1.96 ± 0.50 b
18:3n-6	0.37 ± 0.28	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	18:3n-6	0.39 ± 0.19 a	0.02 ± 0.05 b	0.00 ± 0.00 b
20:2n-6	0.41 ± 0.13	0.37 ± 0.17	0.50 ± 0.14	20:2n-6	0.37 ± 0.07	0.38 ± 0.06	0.36 ± 0.07
20:3n-6	0.60 ± 0.31 a	0.04 ± 0.08 b	0.01 ± 0.03 b	20:3n-6	0.35 ± 0.17 a	0.03 ± 0.09 b	0.00 ± 0.00 b
20:4n-6	0.87 ± 0.38 a	2.24 ± 0.79 b	2.63 ± 1.12 b	20:4n-6	0.94 ± 0.34 a	2.65 ± 1.42 b	3.41 ± 2.22 b
22:2n-6	0.61 ± 0.14	0.43 ± 0.22	0.61 ± 0.16	22:2n-6	0.50 ± 0.05	0.30 ± 0.16	0.46 ± 0.61
22:4n-6	0.08 ± 0.12	0.12 ± 0.33	0.02 ± 0.06	22:4n-6	0.06 ± 0.06	0.10 ± 0.13	0.29 ± 0.32
Total n-6 PUFA	11.17 ± 4.05 a	6.14 ± 1.97 b	5.58 ± 1.45 b	Total n-6 PUFA	17.24 ± 4.47 a	6.41 ± 2.11 b	6.48 ± 2.91 b
18:3n-3	0.92 ± 0.47 a	0.58 ± 0.31 ab	0.45 ± 0.19 b	18:3n-3	1.90 ± 0.27 a	0.64 ± 0.29 b	0.38 ± 0.14 c
18:4n-3	0.40 ± 0.22	0.40 ± 0.27	0.24 ± 0.24	18:4n-3	0.95 ± 0.18 a	0.74 ± 0.57 ab	0.38 ± 0.29 b
20:3n-3	0.04 ± 0.06	0.10 ± 0.17	0.11 ± 0.16	20:3n-3	0.01 ± 0.04	0.07 ± 0.13	0.09 ± 0.13
20:5n-3	4.17 ± 1.54 a	5.28 ± 1.01 ab	6.04 ± 1.82 b	20:5n-3	6.53 ± 1.47	6.15 ± 2.45	4.69 ± 2.49
22:5n-3	1.28 ± 0.46 a	0.74 ± 0.59 b	1.08 ± 0.40 ab	22:5n-3	1.01 ± 0.22	0.58 ± 0.14	0.75 ± 1.19
22:6n-3	9.44 ± 2.98 a	16.50 ± 4.12 b	19.73 ± 5.96 b	22:6n-3	9.50 ± 3.65	16.80 ± 7.00	14.42 ± 8.96
Total n-3 PUFA	16.24 ± 5.20 a	23.60 ± 4.43 b	27.64 ± 7.87 b	Total n-3 PUFA	19.89 ± 4.69	24.99 ± 8.98	20.73 ± 11.94
Total PUFA	27.41 ± 8.02	29.74 ± 4.09	33.23 ± 9.01	Total PUFA	37.13 ± 5.16	31.39 ± 8.47	27.20 ± 14.28

Table S7. Total fatty acid profile of *P. saltatrix*. Significant differences are shown in red.

FLESH	Group A	Group B	Group C	BRAIN	Group A	Group B	Group C
14:0	2.12 ± 1.18	1.19 ± 0.91	1.35 ± 0.96	14:0	0.88 ± 0.77	0.79 ± 0.71	0.48 ± 0.75
15:0	0.35 ± 0.10	0.42 ± 0.48	0.56 ± 0.47	15:0	0.17 ± 0.12 ab	0.21 ± 0.32 a	0.05 ± 0.09 b
16:0	21.14 ± 1.96	21.67 ± 2.41	24.03 ± 3.41	16:0	19.52 ± 1.62	20.77 ± 2.00	21.72 ± 1.95
18:0	7.52 ± 2.25	9.09 ± 2.80	9.68 ± 1.89	18:0	10.64 ± 2.02 a	12.42 ± 2.30 ab	13.18 ± 1.48 b
20:0	0.28 ± 0.06	0.31 ± 0.09	0.34 ± 0.06	20:0	0.40 ± 0.05	0.36 ± 0.14	0.39 ± 0.03
22:0	0.18 ± 0.13	0.30 ± 0.27	0.38 ± 0.17	22:0	0.45 ± 0.20	0.57 ± 0.26	0.60 ± 0.11
Total saturated	31.58 ± 2.14 a	32.98 ± 2.68 a	36.34 ± 3.36 b	Total saturated	32.06 ± 2.39 a	35.12 ± 3.67 ab	36.41 ± 2.60 b
16:1n-7	3.53 ± 1.37	2.69 ± 1.50	3.12 ± 1.07	16:1n-7	3.83 ± 0.62	3.22 ± 0.88	2.90 ± 0.72
18:1n-9	19.27 ± 4.73	18.93 ± 8.41	19.29 ± 5.29	18:1n-9	30.26 ± 3.77 a	27.67 ± 3.12 ab	25.69 ± 1.24 b
18:1n-7	2.78 ± 0.73	2.24 ± 0.66	2.43 ± 0.61	18:1n-7	2.55 ± 0.76	2.16 ± 0.39	1.94 ± 0.44
20:1n-9	1.05 ± 0.28	0.79 ± 0.28	0.91 ± 0.32	20:1n-9	1.11 ± 0.27 a	0.84 ± 0.13 ab	0.78 ± 0.13 b
22:1n-9	0.25 ± 0.06	0.23 ± 0.11	0.31 ± 0.10	22:1n-9	0.35 ± 0.07	0.21 ± 0.14	0.30 ± 0.12
24:1n-9	0.89 ± 1.16	1.64 ± 1.38	1.53 ± 1.28	24:1n-9	3.63 ± 1.37	3.38 ± 0.64	3.31 ± 0.76
Total monounsaturated	27.77 ± 6.82	26.52 ± 10.80	27.59 ± 7.40	Total monounsaturated	41.73 ± 4.29 a	37.48 ± 3.63 a	34.92 ± 0.70 b
18:2n-6	7.25 ± 5.30 a	3.29 ± 4.95 ab	0.83 ± 0.33 b	18:2n-6	3.38 ± 3.30 a	1.52 ± 1.41 a	0.49 ± 0.35 b
18:3n-6	0.20 ± 0.16	0.11 ± 0.18	0.08 ± 0.11	18:3n-6	0.06 ± 0.11	0.02 ± 0.07	0.00 ± 0.00
20:2n-6	0.38 ± 0.17	0.23 ± 0.17	0.18 ± 0.11	20:2n-6	0.12 ± 0.18	0.07 ± 0.12	0.00 ± 0.00
20:3n-6	0.20 ± 0.11	0.15 ± 0.13	0.17 ± 0.08	20:3n-6	0.06 ± 0.10	0.01 ± 0.06	0.03 ± 0.08
20:4n-6	2.46 ± 1.23	2.75 ± 0.91	3.04 ± 0.64	20:4n-6	2.24 ± 0.46	2.47 ± 0.61	2.88 ± 0.65
22:2n-6	0.35 ± 0.20	0.29 ± 0.11	0.32 ± 0.09	22:2n-6	0.59 ± 0.62	0.32 ± 0.12	0.40 ± 0.07
22:4n-6	0.30 ± 0.13	0.38 ± 0.13	0.38 ± 0.11	22:4n-6	0.37 ± 0.07	0.35 ± 0.10	0.43 ± 0.08
Total n-6 PUFA	11.15 ± 4.82 a	7.21 ± 4.74 ab	5.00 ± 0.48 b	Total n-6 PUFA	6.83 ± 3.52	4.77 ± 1.62	4.22 ± 0.78
18:3n-3	1.35 ± 0.54 a	0.72 ± 0.57 b	0.73 ± 0.61 ab	18:3n-3	0.38 ± 0.42	0.15 ± 0.18	0.13 ± 0.29
18:4n-3	0.41 ± 0.26	0.26 ± 0.21	0.28 ± 0.22	18:4n-3	0.17 ± 0.16	0.09 ± 0.12	0.11 ± 0.23
20:3n-3	0.40 ± 0.44	0.12 ± 0.29	0.29 ± 0.77	20:3n-3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
20:5n-3	4.74 ± 0.99	4.03 ± 0.91	4.09 ± 0.75	20:5n-3	3.33 ± 0.36	3.01 ± 0.64	3.14 ± 0.65
22:5n-3	1.62 ± 0.41	1.26 ± 0.39	1.52 ± 0.39	22:5n-3	1.06 ± 0.26	0.98 ± 0.25	1.14 ± 0.55
22:6n-3	20.98 ± 8.09	26.89 ± 12.00	24.17 ± 7.59	22:6n-3	14.45 ± 2.58 a	18.40 ± 3.91 b	19.93 ± 2.12 b
Total n-3 PUFA	29.50 ± 8.06	33.29 ± 12.45	31.08 ± 7.77	Total n-3 PUFA	19.39 ± 1.93 a	22.63 ± 4.15 b	24.44 ± 2.08 b
Total PUFA	40.65 ± 6.55	40.49 ± 12.05	36.08 ± 7.99	Total PUFA	26.21 ± 3.95	27.40 ± 4.44	28.66 ± 2.45
LIVER	Group A	Group B	Group C	GONAD	Group A	Group B	Group C
14:0	2.38 ± 0.30 a	1.85 ± 0.66 b	2.18 ± 0.25 ab	14:0	2.32 ± 1.07	1.91 ± 1.27	1.49 ± 1.02
15:0	0.40 ± 0.24	0.48 ± 0.34	0.35 ± 0.14	15:0	0.44 ± 0.10	0.74 ± 0.67	0.50 ± 0.22
16:0	24.47 ± 3.86	27.75 ± 5.59	29.99 ± 4.33	16:0	23.26 ± 3.20	27.33 ± 6.59	26.72 ± 5.45
18:0	7.88 ± 0.73	8.16 ± 2.34	7.14 ± 1.44	18:0	9.27 ± 1.85 a	13.47 ± 4.52 b	12.91 ± 2.26 ab
20:0	0.27 ± 0.04	0.27 ± 0.05	0.26 ± 0.05	20:0	0.30 ± 0.06	0.36 ± 0.23	0.37 ± 0.11
22:0	0.23 ± 0.11	0.29 ± 0.06	0.29 ± 0.07	22:0	0.21 ± 0.10	0.33 ± 0.23	0.27 ± 0.05
Total saturated	35.62 ± 4.03	38.81 ± 7.19	40.20 ± 5.63	Total saturated	35.81 ± 4.93	44.13 ± 10.90	42.26 ± 7.48
16:1n-7	3.77 ± 0.82	3.77 ± 1.60	4.85 ± 1.16	16:1n-7	3.49 ± 1.29	2.98 ± 1.77	2.76 ± 0.95
18:1n-9	26.62 ± 4.48	24.43 ± 10.46	27.79 ± 5.08	18:1n-9	18.12 ± 2.00	15.52 ± 3.81	15.22 ± 3.04
18:1n-7	3.85 ± 0.50	3.54 ± 0.93	3.73 ± 0.74	18:1n-7	3.37 ± 0.36	3.14 ± 0.88	2.76 ± 1.14
20:1n-9	2.41 ± 0.77	1.93 ± 0.82	2.00 ± 0.45	20:1n-9	1.10 ± 0.23	0.90 ± 0.35	0.90 ± 0.33
22:1n-9	0.67 ± 0.22	0.60 ± 0.27	0.67 ± 0.08	22:1n-9	0.21 ± 0.09	0.17 ± 0.15	0.23 ± 0.07
24:1n-9	0.93 ± 0.26	1.14 ± 0.41	1.08 ± 0.24	24:1n-9	1.21 ± 0.63	1.78 ± 0.72	1.79 ± 0.37
Total monounsaturated	38.25 ± 4.08	35.42 ± 12.50	40.13 ± 4.57	Total monounsaturated	27.49 ± 2.83	24.49 ± 5.53	23.66 ± 4.65
18:2n-6	6.01 ± 3.66 a	2.92 ± 4.00 ab	0.97 ± 0.52 b	18:2n-6	6.01 ± 3.90 a	2.61 ± 2.53 ab	1.70 ± 0.74 b
18:3n-6	0.07 ± 0.07	0.02 ± 0.04	0.05 ± 0.08	18:3n-6	0.12 ± 0.12	0.04 ± 0.10	0.03 ± 0.06
20:2n-6	0.85 ± 0.51 a	0.48 ± 0.41 ab	0.23 ± 0.11 b	20:2n-6	0.45 ± 0.19 a	0.29 ± 0.15 ab	0.24 ± 0.05 b
20:3n-6	0.24 ± 0.13	0.12 ± 0.12	0.15 ± 0.14	20:3n-6	0.19 ± 0.09	0.10 ± 0.11	0.16 ± 0.14
20:4n-6	1.73 ± 1.09	2.35 ± 1.72	2.47 ± 1.20	20:4n-6	5.18 ± 2.56	5.53 ± 2.87	7.54 ± 3.19
22:2n-6	0.55 ± 0.23	0.37 ± 0.22	0.36 ± 0.27	22:2n-6	0.35 ± 0.10	0.21 ± 0.13	0.24 ± 0.13
22:4n-6	0.35 ± 0.12	0.40 ± 0.33	0.39 ± 0.21	22:4n-6	0.39 ± 0.24	0.46 ± 0.33	0.68 ± 0.26
Total n-6 PUFA	9.81 ± 3.74 a	6.65 ± 4.43 ab	4.63 ± 2.42 b	Total n-6 PUFA	12.70 ± 2.99	9.24 ± 3.87	10.58 ± 3.50
18:3n-3	0.62 ± 0.33	0.35 ± 0.36	0.48 ± 0.54	18:3n-3	0.65 ± 0.39 a	0.24 ± 0.26 b	0.36 ± 0.25 ab
18:4n-3	0.10 ± 0.06	0.06 ± 0.10	0.21 ± 0.27	18:4n-3	0.26 ± 0.16	0.10 ± 0.16	0.17 ± 0.13
20:3n-3	0.19 ± 0.10	0.13 ± 0.15	0.17 ± 0.09	20:3n-3	0.18 ± 0.10 a	0.16 ± 0.13 ab	0.05 ± 0.09 b
20:5n-3	2.35 ± 0.35	2.19 ± 0.84	2.04 ± 1.03	20:5n-3	4.46 ± 0.96	3.54 ± 1.51	4.04 ± 1.43
22:5n-3	2.11 ± 0.57	1.55 ± 0.95	1.63 ± 1.17	22:5n-3	1.72 ± 0.38	1.30 ± 0.81	1.90 ± 1.32
22:6n-3	10.95 ± 3.21	14.85 ± 8.29	10.51 ± 3.71	22:6n-3	16.73 ± 5.96	16.81 ± 9.78	16.99 ± 6.99
Total n-3 PUFA	16.32 ± 2.74	19.13 ± 9.05	15.04 ± 5.74	Total n-3 PUFA	24.00 ± 6.70	22.14 ± 11.47	23.49 ± 8.56
Total PUFA	26.13 ± 3.29	25.78 ± 10.87	19.67 ± 7.91	Total PUFA	36.71 ± 6.34	31.38 ± 13.92	34.07 ± 11.22

Table S8. Total fatty acid profile of *C. rhonchus*. Significant differences are shown in red.

FLESH	Group A	Group B	Group C	BRAIN	Group A	Group B	Group C
14:0	3.63 ± 1.09 a	1.39 ± 0.99 b	1.89 ± 1.07 ab	14:0	0.24 ± 0.29	0.28 ± 0.35	0.36 ± 0.82
15:0	0.38 ± 0.06 a	0.50 ± 0.19 ab	0.68 ± 0.30 b	15:0	0.02 ± 0.03	0.15 ± 0.24	0.10 ± 0.27
16:0	18.92 ± 1.83 a	24.17 ± 3.18 b	22.50 ± 1.77 b	16:0	16.75 ± 1.67	18.67 ± 1.83	19.66 ± 2.99
18:0	5.63 ± 1.00 a	9.30 ± 1.75 b	9.44 ± 0.72 b	18:0	10.14 ± 0.42 a	10.83 ± 0.51 a	12.01 ± 0.87 b
20:0	0.31 ± 0.05	0.30 ± 0.04	0.34 ± 0.07	20:0	0.29 ± 0.16	0.23 ± 0.19	0.37 ± 0.15
22:0	0.15 ± 0.09	0.18 ± 0.07	0.20 ± 0.03	22:0	0.67 ± 0.13	0.61 ± 0.27	0.80 ± 0.10
Total saturated	29.01 ± 2.12 a	35.84 ± 3.45 b	35.04 ± 2.78 b	Total saturated	28.11 ± 2.23 a	30.76 ± 2.35 ab	33.30 ± 4.63 b
16:1n-7	6.03 ± 0.66 a	3.42 ± 1.86 b	3.27 ± 1.55 b	16:1n-7	4.51 ± 0.39	4.46 ± 0.29	4.57 ± 0.64
18:1n-9	23.46 ± 1.27 a	16.00 ± 5.71 b	11.96 ± 2.19 b	18:1n-9	30.40 ± 1.26	27.67 ± 1.32	28.93 ± 3.39
18:1n-7	3.37 ± 0.37 a	2.55 ± 0.53 b	3.10 ± 0.75 ab	18:1n-7	1.98 ± 0.38	2.00 ± 0.29	2.01 ± 0.54
20:1n-9	1.49 ± 0.43 a	0.57 ± 0.21 b	0.46 ± 0.10 b	20:1n-9	0.45 ± 0.26	0.37 ± 0.25	0.38 ± 0.06
22:1n-9	0.27 ± 0.04 a	0.06 ± 0.08 b	0.12 ± 0.02 ab	22:1n-9	0.13 ± 0.18	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.15
24:1n-9	0.42 ± 0.08	0.65 ± 0.25	0.65 ± 0.16	24:1n-9	5.78 ± 1.07	5.52 ± 0.72	5.28 ± 1.30
Total monounsaturated	35.03 ± 2.19 a	23.25 ± 7.91 b	19.55 ± 4.14 b	Total monounsaturated	43.25 ± 2.33	40.03 ± 1.56	41.25 ± 4.48
18:2n-6	11.92 ± 2.51 a	2.38 ± 2.59 b	1.24 ± 0.24 b	18:2n-6	3.41 ± 1.23 a	0.63 ± 0.31 b	0.55 ± 0.21 b
18:3n-6	0.25 ± 0.07 a	0.06 ± 0.08 b	0.12 ± 0.10 ab	18:3n-6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
20:2n-6	0.35 ± 0.08 a	0.27 ± 0.09 ab	0.25 ± 0.03 b	20:2n-6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.07
20:3n-6	0.20 ± 0.02	0.15 ± 0.06	0.16 ± 0.02	20:3n-6	0.05 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
20:4n-6	0.89 ± 0.32 a	2.46 ± 0.92 b	2.92 ± 0.67 b	20:4n-6	2.24 ± 0.41 a	2.92 ± 0.44 b	2.46 ± 0.42 ab
22:2n-6	0.51 ± 0.13 a	0.29 ± 0.09 b	0.26 ± 0.05 b	22:2n-6	0.39 ± 0.24	0.42 ± 0.20	0.34 ± 0.13
22:4n-6	0.21 ± 0.03	0.31 ± 0.14	0.20 ± 0.04	22:4n-6	0.51 ± 0.20	0.44 ± 0.07	0.40 ± 0.09
Total n-6 PUFA	14.34 ± 2.35 a	5.91 ± 2.57 b	5.16 ± 0.67 b	Total n-6 PUFA	6.60 ± 1.07 a	4.41 ± 0.44 b	3.77 ± 0.24 c
18:3n-3	1.58 ± 0.33 a	0.43 ± 0.37 b	0.33 ± 0.14 b	18:3n-3	0.13 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.12
18:4n-3	0.76 ± 0.16 a	0.34 ± 0.27 b	0.48 ± 0.33 ab	18:4n-3	0.05 ± 0.10	0.05 ± 0.09	0.08 ± 0.17
20:3n-3	0.14 ± 0.06 a	0.04 ± 0.06 b	0.06 ± 0.07 ab	20:3n-3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
20:5n-3	5.84 ± 1.04	4.43 ± 1.11	6.21 ± 1.98	20:5n-3	3.71 ± 0.53 a	3.20 ± 0.60 ab	2.91 ± 0.49 b
22:5n-3	2.00 ± 0.37 a	1.34 ± 0.26 b	1.64 ± 0.24 ab	22:5n-3	1.43 ± 0.15	1.32 ± 0.14	1.25 ± 0.20
22:6n-3	11.29 ± 3.88 a	28.41 ± 10.28 b	31.54 ± 8.46 b	22:6n-3	16.72 ± 1.75	20.23 ± 1.87	17.40 ± 3.41
Total n-3 PUFA	21.62 ± 3.13 a	35.00 ± 9.55 b	40.25 ± 6.46 b	Total n-3 PUFA	22.03 ± 2.26	24.80 ± 1.93	21.69 ± 3.67
Total PUFA	35.95 ± 2.47	40.91 ± 9.82	45.41 ± 6.78	Total PUFA	28.63 ± 2.51 ab	29.20 ± 2.18 a	25.46 ± 3.76 b
LIVER	Group A	Group B	Group C	GONAD	Group A	Group B	Group C
14:0	3.16 ± 0.82 a	1.73 ± 0.49 b	1.71 ± 0.72 b	14:0	5.26 ± 0.78 a	3.39 ± 0.83 b	4.15 ± 2.09 ab
15:0	0.34 ± 0.09	0.68 ± 0.70	0.44 ± 0.25	15:0	0.58 ± 0.19 a	1.26 ± 0.83 b	1.27 ± 0.41 b
16:0	21.43 ± 1.73 a	27.57 ± 3.58 b	31.00 ± 2.64 c	16:0	22.50 ± 3.33 a	27.72 ± 4.46 b	32.10 ± 5.66 b
18:0	6.98 ± 1.02 a	9.58 ± 1.75 b	10.22 ± 1.49 b	18:0	6.06 ± 1.49 a	10.47 ± 2.21 b	12.80 ± 2.16 c
20:0	0.23 ± 0.05	0.27 ± 0.08	0.28 ± 0.15	20:0	0.22 ± 0.09 a	0.37 ± 0.10 b	0.50 ± 0.14 b
22:0	0.03 ± 0.06	0.06 ± 0.11	0.07 ± 0.15	22:0	0.14 ± 0.03 a	0.24 ± 0.10 b	0.34 ± 0.09 b
Total saturated	32.18 ± 2.20 a	39.88 ± 4.71 b	43.73 ± 4.69 b	Total saturated	34.77 ± 4.67 a	43.45 ± 6.23 b	51.17 ± 9.97 b
16:1n-7	6.03 ± 0.57	5.57 ± 1.79	5.59 ± 1.97	16:1n-7	6.94 ± 0.99 a	5.10 ± 1.30 ab	4.19 ± 1.87 b
18:1n-9	27.64 ± 2.60	26.57 ± 7.68	26.09 ± 6.62	18:1n-9	22.69 ± 1.94 a	19.23 ± 3.48 b	15.71 ± 2.04 c
18:1n-7	4.26 ± 0.48 ab	3.82 ± 0.76 a	4.57 ± 0.59 b	18:1n-7	3.62 ± 0.45	3.17 ± 1.09	4.17 ± 0.51
20:1n-9	1.56 ± 0.33 a	0.90 ± 0.17 b	0.93 ± 0.19 b	20:1n-9	1.28 ± 0.27 a	0.81 ± 0.15 b	0.70 ± 0.17 b
22:1n-9	0.21 ± 0.05 a	0.03 ± 0.06 b	0.00 ± 0.00 b	22:1n-9	0.20 ± 0.06 a	0.07 ± 0.07 b	0.07 ± 0.06 b
24:1n-9	0.29 ± 0.10	0.45 ± 0.22	0.54 ± 0.30	24:1n-9	0.39 ± 0.12 a	0.76 ± 0.37 b	0.85 ± 0.24 b
Total monounsaturated	39.99 ± 2.76	37.33 ± 9.27	37.71 ± 8.41	Total monounsaturated	35.10 ± 3.10 a	29.13 ± 4.15 b	25.69 ± 3.33 b
18:2n-6	10.63 ± 2.36 a	2.33 ± 2.68 b	0.79 ± 0.46 b	18:2n-6	10.27 ± 2.07 a	3.02 ± 2.94 b	1.61 ± 1.18 b
18:3n-6	0.17 ± 0.10 a	0.04 ± 0.09 b	0.00 ± 0.00 b	18:3n-6	0.23 ± 0.10 a	0.11 ± 0.09 b	0.10 ± 0.07 b
20:2n-6	0.49 ± 0.15 a	0.27 ± 0.15 b	0.23 ± 0.11 b	20:2n-6	0.32 ± 0.08	0.29 ± 0.12	0.26 ± 0.06
20:3n-6	0.17 ± 0.07 a	0.12 ± 0.09 ab	0.04 ± 0.08 b	20:3n-6	0.15 ± 0.03	0.10 ± 0.07	0.11 ± 0.08
20:4n-6	0.80 ± 0.21 a	2.17 ± 1.20 b	1.96 ± 0.89 b	20:4n-6	0.92 ± 0.27 a	2.93 ± 1.74 b	3.33 ± 2.14 b
22:2n-6	0.53 ± 0.06 a	0.31 ± 0.11 b	0.23 ± 0.14 b	22:2n-6	0.49 ± 0.10 a	0.31 ± 0.08 b	0.20 ± 0.11 c
22:4n-6	0.12 ± 0.08 a	0.40 ± 0.17 b	0.37 ± 0.10 b	22:4n-6	0.12 ± 0.03 a	0.48 ± 0.24 b	0.50 ± 0.30 b
Total n-6 PUFA	12.91 ± 2.51 a	5.65 ± 3.15 b	3.62 ± 1.49 b	Total n-6 PUFA	12.51 ± 2.17 a	7.23 ± 3.30 b	6.11 ± 2.38 b
18:3n-3	1.20 ± 0.23 a	0.32 ± 0.28 b	0.09 ± 0.11 c	18:3n-3	1.49 ± 0.41 a	0.53 ± 0.41 b	0.25 ± 0.14 b
18:4n-3	0.42 ± 0.13 a	0.19 ± 0.12 b	0.08 ± 0.10 b	18:4n-3	0.79 ± 0.37 a	0.45 ± 0.25 ab	0.29 ± 0.17 b
20:3n-3	0.09 ± 0.10	0.05 ± 0.09	0.02 ± 0.07	20:3n-3	0.11 ± 0.04 a	0.05 ± 0.05 b	0.07 ± 0.06 ab
20:5n-3	4.16 ± 0.90	3.15 ± 1.25	2.93 ± 0.94	20:5n-3	5.80 ± 2.74	4.35 ± 1.49	3.73 ± 1.45
22:5n-3	2.12 ± 0.54 a	1.44 ± 0.37 b	1.45 ± 0.52 b	22:5n-3	1.53 ± 0.42	1.33 ± 0.45	1.03 ± 0.40
22:6n-3	7.03 ± 2.16 a	11.99 ± 5.52 b	10.37 ± 3.81 ab	22:6n-3	7.90 ± 2.34 a	13.48 ± 3.45 b	11.66 ± 5.63 ab
Total n-3 PUFA	15.03 ± 2.67	17.14 ± 6.58	14.94 ± 5.00	Total n-3 PUFA	17.62 ± 5.61	20.18 ± 3.98	17.03 ± 7.29
Total PUFA	27.92 ± 4.06 a	22.79 ± 8.27 ab	18.56 ± 6.39 b	Total PUFA	30.13 ± 6.79	27.42 ± 6.27	23.14 ± 9.11

Table S9. Total fatty acid profile of *M. barbatus*. Significant differences are shown in red.

FLESH	Group A	Group B	Group C	BRAIN	Group A	Group B	Group C
14:0	3.46 ± 0.94 a	3.04 ± 0.68 a	1.42 ± 0.83 b	14:0	0.42 ± 0.43	0.35 ± 0.45	0.42 ± 0.71
15:0	1.22 ± 0.44	1.78 ± 1.05	1.83 ± 0.94	15:0	0.24 ± 0.26 a	0.28 ± 0.21 a	0.96 ± 1.03 b
16:0	23.83 ± 2.30	24.31 ± 1.51	24.40 ± 1.65	16:0	20.88 ± 1.73	20.52 ± 2.38	20.65 ± 2.49
18:0	6.92 ± 0.73 a	6.23 ± 1.92 a	8.14 ± 1.19 b	18:0	9.53 ± 1.21 a	9.47 ± 1.91 a	11.58 ± 1.35 b
20:0	0.47 ± 0.06 a	0.44 ± 0.09 a	0.36 ± 0.08 b	20:0	0.46 ± 0.08	0.49 ± 0.11	0.54 ± 0.09
22:0	0.27 ± 0.12	0.30 ± 0.05	0.23 ± 0.09	22:0	0.73 ± 0.27	0.87 ± 0.25	0.84 ± 0.25
Total saturated	36.19 ± 2.52	36.10 ± 3.22	36.38 ± 2.70	Total saturated	32.27 ± 2.98	31.98 ± 3.94	34.98 ± 4.44
16:1n-7	7.42 ± 1.24 a	9.09 ± 2.06 a	4.59 ± 2.51 b	16:1n-7	5.01 ± 0.61 ab	6.07 ± 1.54 b	4.68 ± 1.29 a
18:1n-9	17.12 ± 2.76 a	14.51 ± 4.13 a	8.99 ± 3.63 b	18:1n-9	21.50 ± 2.18	24.22 ± 2.66	23.06 ± 4.43
18:1n-7	4.69 ± 0.58 a	4.95 ± 0.81 a	3.80 ± 0.97 b	18:1n-7	1.68 ± 0.44	1.63 ± 0.46	2.36 ± 1.32
20:1n-9	1.45 ± 0.25 a	0.90 ± 0.23 b	0.67 ± 0.35 c	20:1n-9	0.87 ± 0.11	0.81 ± 0.17	0.80 ± 0.29
22:1n-9	0.28 ± 0.11 a	0.24 ± 0.08 a	0.08 ± 0.10 b	22:1n-9	0.42 ± 0.07 a	0.38 ± 0.16 ab	0.27 ± 0.17 b
24:1n-9	0.27 ± 0.05	0.27 ± 0.11	0.26 ± 0.10	24:1n-9	3.21 ± 0.87	3.84 ± 0.72	3.17 ± 1.27
Total monounsaturated	31.23 ± 4.23 a	29.95 ± 5.96 a	18.39 ± 6.84 b	Total monounsaturated	32.69 ± 3.01 a	36.96 ± 2.74 b	34.34 ± 3.89 ab
18:2n-6	4.71 ± 2.56 a	1.14 ± 0.36 b	0.96 ± 0.17 b	18:2n-6	1.12 ± 0.63 a	0.31 ± 0.28 b	0.59 ± 0.33 a
18:3n-6	0.18 ± 0.07	0.18 ± 0.09	0.12 ± 0.10	18:3n-6	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.03	0.01 ± 0.04
20:2n-6	1.40 ± 0.49 a	0.52 ± 0.14 b	0.59 ± 0.14 b	20:2n-6	0.35 ± 0.26 a	0.03 ± 0.08 b	0.25 ± 0.34 ab
20:3n-6	0.63 ± 0.37 a	0.21 ± 0.18 b	0.29 ± 0.09 b	20:3n-6	0.23 ± 0.22	0.05 ± 0.10	0.11 ± 0.15
20:4n-6	4.04 ± 0.94 a	3.62 ± 1.97 a	6.52 ± 2.87 b	20:4n-6	5.36 ± 0.86 a	4.25 ± 0.74 b	3.89 ± 0.74 b
22:2n-6	0.47 ± 0.17 a	0.35 ± 0.06 ab	0.30 ± 0.07 b	22:2n-6	0.18 ± 0.20	0.16 ± 0.16	0.18 ± 0.21
22:4n-6	0.75 ± 0.49 a	0.74 ± 0.62 a	0.26 ± 0.07 b	22:4n-6	0.33 ± 0.36 a	0.42 ± 0.23 ab	0.60 ± 0.30 b
Total n-6 PUFA	12.17 ± 2.86 a	6.76 ± 2.50 b	9.04 ± 2.93 c	Total n-6 PUFA	7.57 ± 1.65 a	5.24 ± 0.90 b	5.65 ± 1.33 b
18:3n-3	0.86 ± 0.51 a	0.42 ± 0.24 a	0.24 ± 0.10 b	18:3n-3	0.34 ± 0.76	0.04 ± 0.08	0.14 ± 0.26
18:4n-3	0.59 ± 0.33 a	0.39 ± 0.14 a	0.21 ± 0.19 b	18:4n-3	0.05 ± 0.09	0.05 ± 0.10	0.04 ± 0.09
20:3n-3	0.22 ± 0.14 a	0.10 ± 0.09 ab	0.05 ± 0.08 b	20:3n-3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.04
20:5n-3	7.89 ± 1.19 a	9.89 ± 1.86 b	11.57 ± 1.55 c	20:5n-3	3.71 ± 0.95	4.48 ± 1.45	4.69 ± 1.61
22:5n-3	1.85 ± 0.35	1.99 ± 0.71	2.36 ± 0.48	22:5n-3	1.17 ± 0.25	1.11 ± 0.41	1.39 ± 0.48
22:6n-3	9.00 ± 4.21 a	14.40 ± 3.85 b	21.76 ± 6.57 c	22:6n-3	22.20 ± 3.68	20.15 ± 3.20	18.76 ± 6.46
Total n-3 PUFA	20.42 ± 5.06 a	27.19 ± 4.95 b	36.19 ± 7.40 c	Total n-3 PUFA	27.48 ± 3.32	25.83 ± 4.07	25.03 ± 6.23
Total PUFA	32.59 ± 5.51 a	33.95 ± 5.41 a	45.23 ± 8.46 b	Total PUFA	35.05 ± 4.35	31.07 ± 4.66	30.68 ± 5.54
LIVER	Group A	Group B	Group C	GONAD	Group A	Group B	Group C
14:0	2.09 ± 0.39 a	1.69 ± 0.33 a	1.03 ± 0.40 b	14:0	0.36 ± 0.33	0.96 ± 1.41	0.99 ± 0.74
15:0	0.39 ± 0.14 a	0.86 ± 0.84 ab	1.41 ± 0.94 b	15:0	0.45 ± 0.19 a	0.73 ± 0.52 a	1.88 ± 1.11 b
16:0	29.25 ± 2.13	29.31 ± 6.09	32.69 ± 5.98	16:0	24.26 ± 6.39	23.32 ± 4.29	27.38 ± 6.59
18:0	4.39 ± 0.65 a	4.80 ± 1.49 a	8.55 ± 3.92 b	18:0	8.66 ± 3.76	7.82 ± 2.32	10.41 ± 3.87
20:0	0.32 ± 0.05	0.32 ± 0.06	0.40 ± 0.12	20:0	0.31 ± 0.24	0.28 ± 0.19	0.44 ± 0.30
22:0	0.21 ± 0.09	0.29 ± 0.06	0.34 ± 0.18	22:0	0.13 ± 0.22	0.18 ± 0.19	0.23 ± 0.30
Total saturated	36.66 ± 2.37 a	37.27 ± 6.67 a	44.42 ± 8.88 b	Total saturated	34.17 ± 9.97	33.29 ± 5.51	41.31 ± 11.80
16:1n-7	12.18 ± 1.99 a	11.03 ± 4.16 a	5.84 ± 1.67 b	16:1n-7	2.37 ± 1.01 a	4.95 ± 1.99 b	4.25 ± 2.14 b
18:1n-9	23.53 ± 3.69	19.90 ± 6.03	17.34 ± 6.98	18:1n-9	8.53 ± 1.64	8.73 ± 2.98	11.19 ± 4.48
18:1n-7	4.49 ± 0.31	4.96 ± 0.94	4.40 ± 0.90	18:1n-7	3.61 ± 0.79 a	4.31 ± 0.66 ab	4.43 ± 0.75 b
20:1n-9	1.19 ± 0.29	1.00 ± 0.48	1.33 ± 0.92	20:1n-9	0.71 ± 0.23	0.50 ± 0.13	0.72 ± 0.56
22:1n-9	0.34 ± 0.06	0.28 ± 0.10	0.25 ± 0.19	22:1n-9	0.03 ± 0.06	0.01 ± 0.04	0.06 ± 0.16
24:1n-9	0.30 ± 0.06	0.52 ± 0.26	0.45 ± 0.29	24:1n-9	0.55 ± 0.07	1.36 ± 1.26	0.63 ± 0.51
Total monounsaturated	42.02 ± 3.62 a	37.69 ± 8.70 a	29.60 ± 9.06 b	Total monounsaturated	15.81 ± 3.25 a	19.87 ± 3.64 ab	21.27 ± 7.10 b
18:2n-6	2.89 ± 1.21 a	0.67 ± 0.31 b	0.64 ± 0.22 b	18:2n-6	2.74 ± 0.83 a	0.78 ± 0.41 b	1.05 ± 0.39 b
18:3n-6	0.06 ± 0.09	0.01 ± 0.06	0.00 ± 0.00	18:3n-6	0.01 ± 0.03	0.03 ± 0.08	0.00 ± 0.00
20:2n-6	0.65 ± 0.18 a	0.26 ± 0.14 c	0.39 ± 0.16 b	20:2n-6	0.89 ± 0.33 a	0.21 ± 0.20 c	0.47 ± 0.23 b
20:3n-6	0.39 ± 0.24 a	0.13 ± 0.15 b	0.18 ± 0.16 b	20:3n-6	0.66 ± 0.47	0.54 ± 1.62	0.18 ± 0.22
20:4n-6	2.56 ± 0.65	2.81 ± 1.77	3.71 ± 2.01	20:4n-6	10.00 ± 2.24	6.88 ± 2.64	6.82 ± 4.29
22:2n-6	0.40 ± 0.11	0.26 ± 0.16	0.23 ± 0.16	22:2n-6	0.22 ± 0.22	0.34 ± 0.29	0.18 ± 0.20
22:4n-6	0.50 ± 0.24	0.33 ± 0.24	0.41 ± 0.36	22:4n-6	0.98 ± 0.43	0.89 ± 0.63	0.74 ± 0.66
Total n-6 PUFA	7.45 ± 1.94 a	4.46 ± 2.25 b	5.56 ± 2.56 ab	Total n-6 PUFA	15.51 ± 3.30 a	9.67 ± 2.24 b	9.44 ± 4.59 b
18:3n-3	0.35 ± 0.21 a	0.15 ± 0.13 b	0.11 ± 0.20 b	18:3n-3	0.20 ± 0.16	0.28 ± 0.49	0.30 ± 0.49
18:4n-3	0.46 ± 0.16 a	0.12 ± 0.11 b	0.13 ± 0.09 b	18:4n-3	0.53 ± 0.30 a	0.08 ± 0.19 b	0.07 ± 0.11 b
20:3n-3	0.17 ± 0.12 a	0.05 ± 0.09 b	0.02 ± 0.05 b	20:3n-3	0.07 ± 0.10	0.01 ± 0.03	0.01 ± 0.05
20:5n-3	5.10 ± 1.21	5.64 ± 2.06	6.13 ± 3.74	20:5n-3	9.76 ± 1.90	10.38 ± 1.90	8.49 ± 4.82
22:5n-3	1.27 ± 0.27	1.38 ± 0.77	1.84 ± 0.90	22:5n-3	2.63 ± 0.67	2.13 ± 0.83	2.27 ± 1.22
22:6n-3	6.53 ± 1.90	13.23 ± 8.47	12.19 ± 7.35	22:6n-3	21.33 ± 4.22	24.26 ± 7.74	16.83 ± 9.01
Total n-3 PUFA	13.87 ± 3.25	20.57 ± 10.84	20.42 ± 11.66	Total n-3 PUFA	34.52 ± 5.39	37.13 ± 8.84	27.98 ± 14.06
Total PUFA	21.32 ± 4.19	25.04 ± 12.23	25.98 ± 13.36	Total PUFA	50.02 ± 8.06	46.80 ± 8.63	37.42 ± 16.52

Supplementary material: Chapter 5

Table S10. Results of 5-factor multivariate PERMANOVA. MC: Monte Carlo test.

<i>Schizoporella sp.</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	P(MC)	<i>C. equilibra</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	P(MC)
Fatty acids	1	172.25	172.25	21.67	0.0016	-	Fatty acids	1	107.9	107.9	38.193	0.1038	-
Res	10	79.486	79.486				Res	4	113.01	28.252			
Total	11	251.73					Total	5	220.91				
<i>Actiniaria sp.</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)	<i>C. dilatata</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)
Fatty acids	1	555.57	555.57	192.71	0.0967	0.0002	Fatty acids	1	59.727	59.727	12.439	0.0938	0.0082
Res	4	11.532	2.883				Res	4	19.206	48.015			
Total	5	567.1					Total	5	78.933				
<i>P. disticha</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)	<i>A. lixula</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)
Fatty acids	1	168.78	168.78	14.456	0.1042	0.0034	Fatty acids	1	96.109	96.109	2.576	0.0966	-
Res	4	46.701	11.675				Res	4	149.24	37.309			
Total	5	215.48					Total	5	245.35				
<i>Aglaophenia sp.</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)	<i>Polynoidae sp.</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)
Fatty acids	1	17.836	17.836	18.435	0.3054	-	Fatty acids	1	127.9	127.9	70.255	0.1014	0.0162
Res	4	38.701	96.752				Res	4	72.823	18.206			
Total	5	56.537					Total	5	200.73				
<i>P. caerulea</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)	<i>P. stephensonii</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)
Fatty acids	1	95.499	95.499	6.875	0.101	0.017	Fatty acids	1	248.93	248.93	80.803	0.096	0.0098
Res	4	55.563	13.891				Res	4	123.23	30.807			
Total	5	151.06					Total	5	372.15				
<i>M. galloprovincialis</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)	<i>J. rubens</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)
Fatty acids	1	102.82	102.82	54.224	0.0966	0.0394	Fatty acids	1	93.501	93.501	57.194	0.0988	0.02
Res	4	75.846	18.962				Res	4	65.392	16.348			
Total	5	178.66					Total	5	158.89				
<i>P. transversus</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)	<i>C. ciliatum</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)
Fatty acids	1	161.15	161.15	3.7339	0.0074	-	Fatty acids	1	171.17	171.17	4.0491	0.1022	0.0448
Res	12	517.9	43.158				Res	4	169.1	42.275			
Total	13	679.04					Total	5	340.27				
<i>P. hirtellus</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)	Zooplankton	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)
Fatty acids	1	251.3	251.3	8.8291	0.0016	-	Fatty acids	1	15.248	15.248	0.79086	0.5662	-
Res	10	284.63	28.463				Res	14	269.92	19.28			
Total	11	535.93					Total	15	285.17				
<i>Balanus sp.</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)	Sediment	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)
Fatty acids	1	91.167	91.167	10.335	0.1084	0.0218	Fatty acids	1	587.98	587.98	41.241	0.0022	-
Res	4	35.286	88.215				Res	9	128.32	14.257			
Total	5	126.45					Total	10	716.3				
<i>Elasmopus sp.</i>	d.f.	SS	MS	Pseudo-F	P	P(MC)							
Fatty acids	1	86.552	86.552	99.898	0.098	0.0156							
Res	4	34.656	8.664										
Total	5	121.21											

Table S11. Similarity percentages (SIMPER), showing the three fatty acids which contributed most to the dissimilarities found by PERMANOVA. The cumulative percentage (Cum.%) and the average dissimilarity (Av. Dis.) between groups are also shown.

<i>Schizoporella sp.</i>		<i>Actinaria sp.</i>		<i>P. disticha</i>		<i>P. caerulea</i>	
18:1n-9	9.06	18:1n-9	16.29	18:1n-9	14.56	20:4n-6	11.23
18:3n-6	7.83	18:2n-6	9.39	20:1n-9	8.70	16:1n-7	9.72
22:2n-6	6.90	22:6n-3	7.82	18:0	7.84	18:3n-3	6.28
Cum%	23.79	Cum%	33.50	Cum%	31.10	Cum%	27.23
Av. Dis.	10.83	Av. Dis.	19.32	Av. Dis.	11.30	Av. Dis.	8.93
<i>M. galloprovincialis</i>		<i>P. transversus</i>		<i>P. hirtellus</i>		<i>Balanus sp.</i>	
18:1n-9	18.20	22:6n-3	9.36	18:2n-6	10.9	18:1n-9	13.89
22:6n-3	13.96	18:1n-9	7.43	18:1n-9	10.52	20:1n-9	9.72
18:3n-3	12.83	16:0	7.31	20:1n-9	7.62	18:2n-6	9.46
Cum%	44.99	Cum%	24.1	Cum%	29.03	Cum%	33.06
Av. Dis.	9.24	Av. Dis.	10.67	Av. Dis.	10.92	Av. Dis.	7.99
<i>Elasmopus sp.</i>		<i>C. dilatata</i>		<i>Polynoidae sp.</i>		<i>P. stephensonii</i>	
20:1n-9	12.57	18:1n-9	11.36	18:1n-9	11.18	18:1n-9	12.20
18:1n-9	11.71	24:1n-9	10.45	20:3n-3	7.08	22:1n-9	8.50
18:2n-6	10.98	20:3n-3	8.47	18:2n-6	7.06	20:5n-3	7.44
Cum%	35.27	Cum%	30.29	Cum%	25.32	Cum%	28.14
Av. Dis.	8.05	Av. Dis.	6.70	Av. Dis.	10.36	Av. Dis.	14.22
<i>J. rubens</i>		<i>C. ciliatum</i>		<i>Sediment</i>			
18:3n-3	11.79	16:1n-7	13.23	20:5n-3	13.04		
20:3n-3	11.47	20:5n-3	12.41	18:1n-9	10.7		
22:1n-9	8.48	18:2n-6	12.4	22:6n-3	10.38		
Cum%	31.74	Cum%	38.05	Cum%	34.12		
Av. Dis.	9.06	Av. Dis.	12.95	Av. Dis.	15.49		

Table S12. Complete fatty acid profile of all samples.

<i>Schizoporella</i> sp.	Active farm	Control farm	<i>Actiniaria</i> sp.	Active farm	Control farm
14:0	4.32 ± 0.67	6.25 ± 0.39	14:0	3.17 ± 0.15	1.09 ± 0.05
15:9	1.10 ± 0.51	0.90 ± 0.12	15:9	0.42 ± 0.03	0.47 ± 0.02
16:0	23.36 ± 5.73	22.32 ± 1.00	16:0	13.72 ± 0.29	14.12 ± 0.74
18:0	8.76 ± 2.59	8.33 ± 0.08	18:0	4.52 ± 0.38	9.27 ± 0.06
20:0	0.81 ± 0.17	0.85 ± 0.25	20:0	0.41 ± 0.02	0.76 ± 0.06
22:0	1.07 ± 0.22	0.72 ± 0.05	22:0	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.25
Total saturated	39.41 ± 8.72	39.37 ± 0.56	Total saturated	22.49 ± 0.57	25.98 ± 0.50
16:1n-7	3.53 ± 1.20	2.64 ± 0.26	16:1n-8	4.33 ± 0.25	1.26 ± 0.11
18:1n-9	11.61 ± 4.36	6.82 ± 0.26	18:1n-9	18.26 ± 1.33	3.38 ± 0.12
18:1n-7	2.81 ± 0.44	2.26 ± 0.18	18:1n-7	2.92 ± 0.09	1.92 ± 0.08
20:1n-9	3.03 ± 0.77	2.96 ± 0.81	20:1n-10	4.05 ± 0.28	0.66 ± 0.08
22:1n-9	0.46 ± 0.54	0.14 ± 0.08	22:1n-10	1.73 ± 0.15	2.25 ± 0.16
24:1n-9	0.52 ± 0.77	0.12 ± 0.09	24:1n-10	0.68 ± 0.01	0.50 ± 0.02
Total monounsaturated	21.96 ± 7.24	14.94 ± 0.69	Total monounsaturated	31.97 ± 2.10	9.97 ± 0.03
18:2n-6	3.83 ± 1.15	4.44 ± 0.31	18:2n-7	7.18 ± 0.47	1.52 ± 0.10
18:3n-6	0.67 ± 0.78	1.30 ± 0.81	18:3n-7	0.13 ± 0.01	0.72 ± 0.08
20:2n-6	2.49 ± 0.48	2.41 ± 0.20	20:2n-7	1.39 ± 0.01	1.37 ± 0.06
20:3n-6	0.38 ± 0.13	0.40 ± 0.11	20:3n-7	0.18 ± 0.01	0.06 ± 0.06
20:4n-6	2.76 ± 0.63	4.00 ± 0.53	20:4n-7	1.17 ± 0.15	2.61 ± 0.20
22:2n-6	0.44 ± 0.38	0.00 ± 0.00	22:2n-7	0.17 ± 0.11	0.14 ± 0.04
22:4n-6	0.71 ± 0.55	0.60 ± 0.29	22:4n-7	1.49 ± 0.25	4.84 ± 0.36
Total n-6 PUFA	11.27 ± 1.15	13.15 ± 0.76	Total n-6 PUFA	11.71 ± 0.13	11.26 ± 0.36
18:3n-3	0.93 ± 0.46	2.08 ± 0.21	18:3n-4	0.55 ± 0.02	1.19 ± 0.09
18:4n-3	1.19 ± 0.43	1.85 ± 0.22	18:4n-4	0.87 ± 0.05	0.37 ± 0.05
20:3n-3	0.78 ± 0.43	0.40 ± 0.07	20:3n-4	1.53 ± 0.06	0.48 ± 0.02
20:5n-3	5.87 ± 1.68	6.35 ± 0.69	20:5n-4	10.23 ± 0.49	15.96 ± 0.40
22:5n-3	1.46 ± 0.92	0.78 ± 0.35	22:5n-4	3.84 ± 0.19	7.85 ± 0.43
22:6n-3	17.13 ± 4.23	21.07 ± 0.35	22:6n-4	16.81 ± 0.81	26.92 ± 0.66
Total n-3 PUFA	27.36 ± 6.99	32.53 ± 1.03	Total n-3 PUFA	33.83 ± 1.47	52.78 ± 0.14
Total PUFA	38.63 ± 7.91	45.68 ± 0.55	Total PUFA	45.54 ± 1.53	64.05 ± 0.48
<hr/>					
<i>P. disticha</i>	Active farm	Control farm	<i>Aglaophenia</i> sp.	Active farm	Control farm
14:0	6.61 ± 0.61	7.50 ± 0.84	14:0	3.17 ± 0.50	3.20 ± 0.91
15:9	0.84 ± 0.05	1.21 ± 0.08	15:9	0.87 ± 0.02	0.99 ± 0.13
16:0	17.30 ± 1.44	22.71 ± 0.17	16:0	26.04 ± 1.33	26.34 ± 1.46
18:0	8.53 ± 0.73	12.91 ± 0.97	18:0	11.04 ± 0.19	11.03 ± 1.92
20:0	0.62 ± 0.10	0.99 ± 0.11	20:0	1.87 ± 0.26	1.90 ± 0.51
22:0	0.84 ± 0.13	1.33 ± 0.17	22:0	0.49 ± 0.32	0.34 ± 0.05
Total saturated	34.74 ± 0.75	46.65 ± 2.02	Total saturated	43.49 ± 0.86	43.81 ± 2.97
16:1n-9	3.43 ± 0.08	4.05 ± 0.26	16:1n-10	2.70 ± 0.43	2.84 ± 0.16
18:1n-9	14.05 ± 0.65	6.25 ± 1.09	18:1n-9	5.08 ± 0.70	3.69 ± 0.37
18:1n-7	2.96 ± 0.08	2.23 ± 1.93	18:1n-7	2.10 ± 0.17	1.86 ± 0.16
20:1n-11	2.29 ± 0.71	0.52 ± 0.14	20:1n-12	0.66 ± 0.06	0.40 ± 0.03
22:1n-11	0.97 ± 0.10	0.14 ± 0.05	22:1n-12	0.19 ± 0.03	0.13 ± 0.01
24:1n-11	0.41 ± 0.00	0.33 ± 0.04	24:1n-12	1.06 ± 0.20	0.96 ± 0.08
Total monounsaturated	24.11 ± 0.41	13.51 ± 0.56	Total monounsaturated	11.80 ± 0.34	9.87 ± 0.68
18:2n-8	4.63 ± 0.20	2.33 ± 0.06	18:2n-9	2.60 ± 0.12	2.05 ± 0.53
18:3n-8	0.13 ± 0.05	0.24 ± 0.02	18:3n-9	0.44 ± 0.31	0.96 ± 0.43
20:2n-8	0.72 ± 0.04	0.53 ± 0.10	20:2n-9	0.76 ± 0.01	0.56 ± 0.03
20:3n-8	0.20 ± 0.17	0.20 ± 0.02	20:3n-9	0.18 ± 0.04	0.15 ± 0.00
20:4n-8	8.05 ± 0.90	9.36 ± 0.91	20:4n-9	1.62 ± 0.04	1.58 ± 0.11
22:2n-8	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	22:2n-9	0.04 ± 0.03	0.02 ± 0.02
22:4n-8	0.49 ± 0.05	1.08 ± 0.08	22:4n-9	1.68 ± 0.02	2.09 ± 0.78
Total n-6 PUFA	14.21 ± 0.89	13.75 ± 0.71	Total n-6 PUFA	7.33 ± 0.23	7.42 ± 0.66
18:3n-5	0.56 ± 0.58	1.06 ± 0.01	18:3n-6	0.86 ± 0.02	0.89 ± 0.25
18:4n-5	0.95 ± 0.06	1.35 ± 0.24	18:4n-6	0.96 ± 0.10	0.96 ± 0.39
20:3n-5	0.43 ± 0.10	0.09 ± 0.04	20:3n-6	0.16 ± 0.01	0.13 ± 0.04
20:5n-5	8.02 ± 0.54	6.79 ± 1.66	20:5n-6	7.25 ± 0.15	6.71 ± 1.21
22:5n-5	0.96 ± 0.08	1.03 ± 0.28	22:5n-6	1.25 ± 0.03	1.27 ± 0.11
22:6n-5	16.03 ± 0.49	15.78 ± 1.56	22:6n-6	26.89 ± 0.72	28.95 ± 2.08
Total n-3 PUFA	26.94 ± 0.42	26.09 ± 3.25	Total n-3 PUFA	37.38 ± 0.92	38.90 ± 3.22
Total PUFA	41.15 ± 0.48	39.84 ± 2.58	Total PUFA	44.71 ± 1.13	46.32 ± 2.86

Table S12. Complete fatty acid profile of all samples (continued).

<i>P. caerulea</i>	Active farm	Control farm	<i>M. galloprovincialis</i>	Active farm	Control farm
14:0	7.45 ± 1.20	6.58 ± 1.72	14:0	3.18 ± 0.20	3.70 ± 0.76
15:9	1.59 ± 0.10	1.05 ± 0.13	15:9	0.83 ± 0.05	0.92 ± 0.10
16:0	18.84 ± 0.46	17.12 ± 1.60	16:0	20.90 ± 1.49	20.63 ± 0.71
18:0	5.50 ± 0.22	5.55 ± 0.60	18:0	4.42 ± 0.23	4.76 ± 1.11
20:0	0.40 ± 0.19	0.21 ± 0.04	20:0	0.10 ± 0.03	0.09 ± 0.03
22:0	0.43 ± 0.25	0.24 ± 0.06	22:0	0.36 ± 0.01	0.33 ± 0.04
Total saturated	34.22 ± 1.35	30.75 ± 2.49	Total saturated	29.80 ± 1.71	30.44 ± 0.27
16:1n-11	2.67 ± 0.51	5.52 ± 1.23	16:1n-12	3.01 ± 0.34	2.73 ± 0.89
18:1n-9	6.89 ± 0.79	4.81 ± 0.54	18:1n-9	8.81 ± 1.02	2.98 ± 0.44
18:1n-7	8.03 ± 0.95	9.08 ± 0.62	18:1n-7	2.35 ± 0.20	1.47 ± 0.25
20:1n-13	4.90 ± 0.91	5.05 ± 0.90	20:1n-14	1.70 ± 0.27	3.61 ± 3.43
22:1n-13	0.45 ± 0.16	0.05 ± 0.01	22:1n-14	0.23 ± 0.08	0.03 ± 0.03
24:1n-13	0.14 ± 0.02	0.03 ± 0.00	24:1n-14	0.08 ± 0.02	0.03 ± 0.00
Total			Total		
monounsaturated	23.07 ± 2.27	24.54 ± 0.59	monounsaturated	16.18 ± 1.64	10.85 ± 2.02
18:2n-10	3.32 ± 0.56	1.97 ± 0.17	18:2n-11	5.48 ± 0.71	3.04 ± 0.42
18:3n-10	0.27 ± 0.12	0.34 ± 0.10	18:3n-11	0.06 ± 0.04	0.08 ± 0.04
20:2n-10	3.32 ± 0.35	2.61 ± 0.40	20:2n-11	1.27 ± 0.09	1.25 ± 0.12
20:3n-10	1.82 ± 0.46	1.07 ± 0.22	20:3n-11	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01
20:4n-10	8.62 ± 0.39	13.97 ± 3.07	20:4n-11	2.70 ± 0.24	3.13 ± 0.95
22:2n-10	0.09 ± 0.07	0.08 ± 0.02	22:2n-11	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.02
22:4n-10	0.94 ± 0.08	0.74 ± 0.06	22:4n-11	0.25 ± 0.02	0.33 ± 0.11
Total n-6 PUFA	18.37 ± 1.23	20.77 ± 3.16	Total n-6 PUFA	9.92 ± 0.56	8.03 ± 0.78
18:3n-7	1.61 ± 0.25	3.02 ± 0.65	18:3n-8	7.14 ± 0.81	3.67 ± 2.60
18:4n-7	1.03 ± 0.31	0.69 ± 0.12	18:4n-8	1.19 ± 0.08	1.29 ± 0.57
20:3n-7	2.89 ± 0.59	1.53 ± 0.38	20:3n-8	0.16 ± 0.04	0.12 ± 0.03
20:5n-7	16.62 ± 3.42	16.88 ± 1.22	20:5n-8	8.69 ± 1.00	10.04 ± 0.34
22:5n-7	1.29 ± 0.21	0.82 ± 0.03	22:5n-8	1.21 ± 0.10	0.94 ± 0.19
22:6n-7	0.89 ± 0.38	1.00 ± 0.16	22:6n-8	25.71 ± 3.57	34.64 ± 1.13
Total n-3 PUFA	24.34 ± 3.03	23.95 ± 0.18	Total n-3 PUFA	44.10 ± 3.89	50.68 ± 2.80
Total PUFA	42.71 ± 2.30	44.71 ± 2.98	Total PUFA	54.02 ± 3.34	58.71 ± 2.12

<i>P. longicornis</i>	Active farm	Control farm	<i>P. transversus</i>	Active farm	Control farm
14:0	-	4.01 ± 0.88	14:0	2.16 ± 0.93	2.03 ± 0.88
15:9	-	0.70 ± 0.11	15:9	0.60 ± 0.09	0.69 ± 0.11
16:0	-	21.26 ± 1.99	16:0	23.60 ± 1.94	18.71 ± 1.43
18:0	-	7.79 ± 1.36	18:0	6.51 ± 1.24	6.94 ± 0.37
20:0	-	0.68 ± 0.23	20:0	0.49 ± 0.19	0.52 ± 0.06
22:0	-	0.58 ± 0.29	22:0	0.54 ± 0.17	0.48 ± 0.08
Total saturated	-	35.03 ± 1.27	Total saturated	33.89 ± 2.38	29.37 ± 1.46
16:1n-24	-	7.96 ± 3.09	16:1n-13	4.31 ± 1.29	3.95 ± 0.74
18:1n-9	-	9.92 ± 1.10	18:1n-9	15.65 ± 1.89	11.48 ± 0.61
18:1n-7	-	3.94 ± 0.17	18:1n-7	2.63 ± 0.60	2.45 ± 0.45
20:1n-26	-	0.27 ± 0.02	20:1n-15	1.80 ± 1.43	0.62 ± 0.34
22:1n-26	-	0.04 ± 0.03	22:1n-15	0.15 ± 0.17	0.11 ± 0.14
24:1n-26	-	0.07 ± 0.06	24:1n-15	0.25 ± 0.08	0.80 ± 0.90
Total			Total		
monounsaturated	-	22.19 ± 4.09	monounsaturated	24.80 ± 2.74	19.42 ± 2.38
18:2n-23	-	3.47 ± 1.06	18:2n-12	4.32 ± 1.48	2.63 ± 0.22
18:3n-23	-	0.14 ± 0.12	18:3n-12	0.25 ± 0.25	0.23 ± 0.04
20:2n-23	-	0.61 ± 0.12	20:2n-12	1.26 ± 0.31	1.21 ± 0.13
20:3n-23	-	0.13 ± 0.12	20:3n-12	0.25 ± 0.14	0.28 ± 0.11
20:4n-23	-	4.17 ± 1.19	20:4n-12	4.48 ± 0.74	7.12 ± 1.74
22:2n-23	-	0.00 ± 0.00	22:2n-12	0.25 ± 0.19	0.19 ± 0.20
22:4n-23	-	0.24 ± 0.14	22:4n-12	0.08 ± 0.10	0.18 ± 0.11
Total n-6 PUFA	-	8.75 ± 2.34	Total n-6 PUFA	10.89 ± 2.33	11.85 ± 1.80
18:3n-20	-	0.72 ± 0.10	18:3n-9	1.09 ± 1.42	1.15 ± 0.71
18:4n-20	-	0.77 ± 0.32	18:4n-9	0.80 ± 0.85	0.64 ± 0.41
20:3n-20	-	0.11 ± 0.09	20:3n-9	0.49 ± 0.24	0.29 ± 0.13
20:5n-20	-	15.53 ± 2.22	20:5n-9	14.59 ± 2.26	18.92 ± 1.51
22:5n-20	-	0.24 ± 0.03	22:5n-9	0.42 ± 0.11	0.38 ± 0.18
22:6n-20	-	16.66 ± 2.21	22:6n-9	13.02 ± 3.46	17.99 ± 3.89
Total n-3 PUFA	-	34.03 ± 4.31	Total n-3 PUFA	30.42 ± 3.47	39.36 ± 5.26
Total PUFA	-	42.78 ± 4.91	Total PUFA	41.31 ± 3.09	51.21 ± 3.63

Table S12. Complete fatty acid profile of all samples (continued).

<i>P. hirtellus</i>	Active farm	Control farm	<i>Balanus sp.</i>	Active farm	Control farm
14:0	2.23 ± 0.17	1.54 ± 0.69	14:0	4.57 ± 1.22	5.78 ± 0.41
15:9	0.62 ± 0.08	0.74 ± 0.15	15:9	0.82 ± 0.18	1.17 ± 0.05
16:0	19.70 ± 2.63	21.03 ± 2.56	16:0	15.96 ± 1.04	15.19 ± 0.27
18:0	5.63 ± 0.90	7.72 ± 0.75	18:0	4.64 ± 0.25	4.00 ± 0.25
20:0	0.67 ± 0.12	0.73 ± 0.08	20:0	0.42 ± 0.01	0.38 ± 0.04
22:0	0.43 ± 0.06	0.49 ± 0.09	22:0	0.30 ± 0.09	0.23 ± 0.03
Total saturated	29.28 ± 3.50	32.25 ± 2.82	Total saturated	26.70 ± 0.10	26.75 ± 0.48
16:1n-14	3.60 ± 1.26	5.03 ± 1.63	16:1n-15	3.97 ± 0.47	5.15 ± 0.41
18:1n-9	19.32 ± 3.52	13.32 ± 1.49	18:1n-9	10.91 ± 1.34	6.22 ± 0.27
18:1n-7	2.52 ± 0.29	2.28 ± 0.19	18:1n-7	2.96 ± 0.41	2.55 ± 0.16
20:1n-16	1.85 ± 1.46	0.78 ± 0.30	20:1n-17	1.38 ± 0.12	0.39 ± 0.27
22:1n-16	0.51 ± 0.34	0.23 ± 0.10	22:1n-17	0.15 ± 0.13	0.31 ± 0.02
24:1n-16	0.38 ± 0.11	0.08 ± 0.11	24:1n-17	0.49 ± 0.04	0.36 ± 0.04
Total			Total		
monounsaturated	28.18 ± 4.17	21.71 ± 1.90	monounsaturated	19.85 ± 1.33	14.98 ± 0.51
18:2n-13	5.41 ± 2.09	2.12 ± 0.41	18:2n-14	4.38 ± 0.21	2.33 ± 0.12
18:3n-13	0.07 ± 0.08	0.09 ± 0.10	18:3n-14	0.10 ± 0.09	0.23 ± 0.02
20:2n-13	1.63 ± 0.36	1.09 ± 0.18	20:2n-14	0.85 ± 0.02	0.62 ± 0.02
20:3n-13	0.15 ± 0.08	0.05 ± 0.08	20:3n-14	0.08 ± 0.07	0.12 ± 0.01
20:4n-13	3.94 ± 0.80	6.40 ± 0.89	20:4n-14	1.83 ± 0.14	1.95 ± 0.14
22:2n-13	0.28 ± 0.27	0.22 ± 0.18	22:2n-14	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.01
22:4n-13	0.42 ± 0.08	0.56 ± 0.19	22:4n-14	0.04 ± 0.04	0.07 ± 0.00
Total n-6 PUFA	11.90 ± 2.02	10.53 ± 1.19	Total n-6 PUFA	7.29 ± 0.17	5.39 ± 0.10
18:3n-10	1.42 ± 1.21	0.66 ± 0.40	18:3n-11	1.48 ± 0.24	1.78 ± 0.31
18:4n-10	0.35 ± 0.06	0.28 ± 0.05	18:4n-11	1.74 ± 0.46	2.68 ± 0.33
20:3n-10	0.51 ± 0.26	0.31 ± 0.07	20:3n-11	0.24 ± 0.25	0.24 ± 0.03
20:5n-10	11.39 ± 2.33	15.32 ± 1.13	20:5n-11	13.49 ± 0.28	14.84 ± 0.37
22:5n-10	1.17 ± 0.44	0.94 ± 0.30	22:5n-11	0.65 ± 0.04	0.41 ± 0.01
22:6n-10	15.80 ± 3.28	18.00 ± 2.42	22:6n-11	28.55 ± 0.79	32.94 ± 0.55
Total n-3 PUFA	30.64 ± 5.96	35.50 ± 3.72	Total n-3 PUFA	46.16 ± 1.39	52.89 ± 0.88
Total PUFA	42.54 ± 4.58	46.03 ± 4.68	Total PUFA	53.45 ± 1.24	58.28 ± 0.88
<i>Elasmopus sp.</i>	Active farm	Control farm	<i>C. equilibra</i>	Active farm	Control farm
14:0	2.49 ± 0.45	1.78 ± 0.16	14:0	2.31 ± 0.63	2.38 ± 0.28
15:9	0.72 ± 0.07	0.74 ± 0.07	15:9	0.68 ± 0.10	0.84 ± 0.02
16:0	19.61 ± 0.34	19.93 ± 0.97	16:0	19.40 ± 3.02	19.35 ± 0.68
18:0	5.08 ± 0.16	6.15 ± 0.11	18:0	4.90 ± 1.56	4.91 ± 0.25
20:0	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.02	20:0	0.31 ± 0.13	0.32 ± 0.03
22:0	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.01	22:0	0.34 ± 0.27	0.05 ± 0.09
Total saturated	28.29 ± 0.52	29.01 ± 1.07	Total saturated	27.94 ± 4.46	27.85 ± 1.14
16:1n-16	1.68 ± 0.32	1.63 ± 0.10	16:1n-17	3.07 ± 0.52	2.72 ± 0.08
18:1n-9	21.66 ± 2.18	16.19 ± 0.22	18:1n-9	15.51 ± 1.06	9.65 ± 0.22
18:1n-7	1.54 ± 0.23	1.35 ± 0.03	18:1n-7	2.41 ± 0.29	1.79 ± 0.04
20:1n-18	2.24 ± 0.27	0.71 ± 0.57	20:1n-19	0.63 ± 0.77	1.35 ± 0.56
22:1n-18	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.07	22:1n-19	0.14 ± 0.13	0.35 ± 0.01
24:1n-18	0.24 ± 0.02	0.20 ± 0.04	24:1n-19	0.41 ± 0.05	0.38 ± 0.07
Total			Total		
monounsaturated	27.54 ± 2.96	20.23 ± 0.72	monounsaturated	22.18 ± 0.57	16.24 ± 0.49
18:2n-15	5.68 ± 1.31	3.01 ± 0.32	18:2n-16	5.16 ± 0.82	2.73 ± 0.03
18:3n-15	0.09 ± 0.01	0.13 ± 0.01	18:3n-16	0.08 ± 0.07	0.17 ± 0.02
20:2n-15	1.18 ± 0.14	0.74 ± 0.04	20:2n-16	1.19 ± 0.03	0.84 ± 0.03
20:3n-15	0.13 ± 0.01	0.17 ± 0.04	20:3n-16	0.12 ± 0.11	0.16 ± 0.03
20:4n-15	4.68 ± 0.70	6.96 ± 1.02	20:4n-16	3.75 ± 0.74	4.48 ± 0.40
22:2n-15	0.05 ± 0.04	0.06 ± 0.01	22:2n-16	0.03 ± 0.03	0.07 ± 0.00
22:4n-15	0.07 ± 0.01	0.15 ± 0.03	22:4n-16	0.18 ± 0.05	0.17 ± 0.02
Total n-6 PUFA	11.89 ± 0.81	11.22 ± 0.67	Total n-6 PUFA	10.52 ± 0.27	8.61 ± 0.32
18:3n-12	0.24 ± 0.06	1.06 ± 0.69	18:3n-13	2.21 ± 1.92	0.70 ± 0.38
18:4n-12	0.31 ± 0.04	0.35 ± 0.02	18:4n-13	0.43 ± 0.38	0.83 ± 0.14
20:3n-12	0.49 ± 0.04	0.21 ± 0.09	20:3n-13	0.28 ± 0.04	0.22 ± 0.04
20:5n-12	14.21 ± 1.85	17.44 ± 0.77	20:5n-13	15.29 ± 1.88	19.98 ± 0.52
22:5n-12	0.44 ± 0.04	0.32 ± 0.01	22:5n-13	1.09 ± 0.19	0.68 ± 0.01
22:6n-12	16.59 ± 2.59	20.16 ± 0.83	22:6n-13	20.06 ± 0.87	24.89 ± 0.68
Total n-3 PUFA	32.28 ± 4.27	39.55 ± 1.17	Total n-3 PUFA	39.36 ± 4.75	47.30 ± 1.25
Total PUFA	44.17 ± 3.47	50.76 ± 1.68	Total PUFA	49.88 ± 5.02	55.91 ± 1.02

Table S12. Complete fatty acid profile of all samples (continued).

<i>C. dilatata</i>	Active farm	Control farm	<i>J. marmorata</i>	Active farm	Control farm
14:0	2.39 ± 0.06	1.87 ± 0.04	14:0	1.86	1.70 ± 0.62
15:9	0.76 ± 0.22	0.83 ± 0.02	15:9	0.81	0.65 ± 0.10
16:0	19.62 ± 1.62	21.68 ± 0.26	16:0	20.08	19.75 ± 0.70
18:0	3.55 ± 0.33	3.73 ± 0.18	18:0	3.51	4.26 ± 0.36
20:0	0.24 ± 0.04	0.20 ± 0.05	20:0	0.27	0.30 ± 0.07
22:0	0.15 ± 0.02	0.11 ± 0.00	22:0	0.36	0.44 ± 0.16
Total saturated	26.71 ± 2.28	28.41 ± 0.01	Total saturated	26.89	27.10 ± 1.14
16:1n-18	2.32 ± 0.09	1.92 ± 0.11	16:1n-24	1.83	2.91 ± 0.83
18:1n-9	15.70 ± 2.44	11.78 ± 0.20	18:1n-9	18.32	13.09 ± 0.32
18:1n-7	1.80 ± 0.18	1.36 ± 0.07	18:1n-7	2.03	1.65 ± 0.11
20:1n-20	2.57 ± 0.24	1.62 ± 0.38	20:1n-26	1.26	0.78 ± 0.02
22:1n-20	0.28 ± 0.17	0.31 ± 0.03	22:1n-26	0.15	0.24 ± 0.05
24:1n-20	0.56 ± 0.10	0.05 ± 0.01	24:1n-26	0.32	0.23 ± 0.00
Total			Total		
monounsaturated	23.23 ± 2.71	17.03 ± 0.36	monounsaturated	23.92	18.89 ± 1.18
18:2n-17	4.73 ± 1.16	3.10 ± 0.05	18:2n-23	4.75	2.69 ± 0.12
18:3n-17	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.01	18:3n-23	0.11	0.24 ± 0.05
20:2n-17	1.10 ± 0.08	0.88 ± 0.02	20:2n-23	1.02	0.65 ± 0.04
20:3n-17	0.16 ± 0.02	0.13 ± 0.01	20:3n-23	0.11	0.09 ± 0.08
20:4n-17	3.13 ± 0.23	3.82 ± 0.06	20:4n-23	3.11	4.04 ± 0.29
22:2n-17	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.01	22:2n-23	0.00	0.04 ± 0.03
22:4n-17	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.00	22:4n-23	0.04	0.12 ± 0.04
Total n-6 PUFA	9.42 ± 1.04	8.24 ± 0.10	Total n-6 PUFA	9.14	7.87 ± 0.39
18:3n-14	0.22 ± 0.01	0.34 ± 0.31	18:3n-20	0.85	0.79 ± 0.09
18:4n-14	0.58 ± 0.03	0.61 ± 0.03	18:4n-20	0.58	0.91 ± 0.06
20:3n-14	0.58 ± 0.07	0.12 ± 0.01	20:3n-20	0.42	0.12 ± 0.02
20:5n-14	15.90 ± 0.45	18.81 ± 0.23	20:5n-20	18.59	20.45 ± 0.29
22:5n-14	0.72 ± 0.18	0.47 ± 0.01	22:5n-20	0.49	0.55 ± 0.13
22:6n-14	22.65 ± 2.03	25.98 ± 0.23	22:6n-20	19.12	23.32 ± 1.85
Total n-3 PUFA	40.64 ± 1.48	46.32 ± 0.32	Total n-3 PUFA	40.05	46.14 ± 1.99
Total PUFA	50.06 ± 0.50	54.56 ± 0.37	Total PUFA	49.19	54.01 ± 2.32

<i>A. lixula</i>	Active farm	Control farm	<i>Ophiotrix</i> sp.	Active farm	Control farm
14:0	3.13 ± 0.90	2.60 ± 0.41	14:0	6,71 ± 0,75	-
15:9	1.05 ± 0.09	1.16 ± 0.13	15:9	0,99 ± 0,06	-
16:0	17.07 ± 0.95	17.21 ± 0.32	16:0	11,91 ± 1,91	-
18:0	6.84 ± 0.90	8.06 ± 1.29	18:0	10,74 ± 2,09	-
20:0	1.06 ± 0.47	1.08 ± 0.09	20:0	1,14 ± 0,39	-
22:0	0.73 ± 0.24	0.55 ± 0.10	22:0	0,34 ± 0,06	-
Total saturated	29.89 ± 1.57	30.66 ± 1.32	Total saturated	31,82 ± 1,45	-
16:1n-19	1.81 ± 0.29	1.59 ± 0.35	16:1n-24	3,22 ± 0,53	-
18:1n-9	2.80 ± 0.91	0.80 ± 0.18	18:1n-9	7,27 ± 6,00	-
18:1n-7	2.56 ± 0.12	2.29 ± 0.30	18:1n-7	5,10 ± 1,01	-
20:1n-21	2.40 ± 0.58	4.52 ± 4.78	20:1n-26	5,15 ± 1,04	-
22:1n-21	0.91 ± 0.89	1.33 ± 0.22	22:1n-26	0,83 ± 0,92	-
24:1n-21	0.63 ± 0.37	0.34 ± 0.05	24:1n-26	0,21 ± 0,13	-
Total			Total		
monounsaturated	11.10 ± 0.52	10.87 ± 4.74	monounsaturated	21,77 ± 6,60	-
18:2n-18	1.95 ± 0.49	0.86 ± 0.29	18:2n-23	3,11 ± 1,99	-
18:3n-18	0.39 ± 0.24	0.74 ± 0.29	18:3n-23	0,16 ± 0,04	-
20:2n-18	3.80 ± 0.55	2.83 ± 1.05	20:2n-23	3,01 ± 0,33	-
20:3n-18	0.39 ± 0.15	0.28 ± 0.02	20:3n-23	0,16 ± 0,03	-
20:4n-18	16.31 ± 4.23	20.60 ± 2.38	20:4n-23	7,71 ± 1,96	-
22:2n-18	0.15 ± 0.09	0.18 ± 0.06	22:2n-23	0,12 ± 0,03	-
22:4n-18	0.70 ± 0.38	1.65 ± 0.52	22:4n-23	0,48 ± 0,19	-
Total n-6 PUFA	23.69 ± 5.07	27.12 ± 2.81	Total n-6 PUFA	14,76 ± 1,14	-
18:3n-15	4.61 ± 1.42	2.03 ± 1.51	18:3n-20	9,92 ± 6,07	-
18:4n-15	0.84 ± 0.26	1.24 ± 0.43	18:4n-20	0,80 ± 0,18	-
20:3n-15	2.43 ± 1.18	0.80 ± 0.07	20:3n-20	0,55 ± 0,07	-
20:5n-15	14.69 ± 3.37	13.45 ± 2.27	20:5n-20	17,04 ± 1,61	-
22:5n-15	1.00 ± 0.23	1.63 ± 0.84	22:5n-20	0,54 ± 0,23	-
22:6n-15	11.75 ± 2.11	12.19 ± 3.45	22:6n-20	2,80 ± 1,02	-
Total n-3 PUFA	35.32 ± 6.81	31.35 ± 4.95	Total n-3 PUFA	31,65 ± 5,98	-
Total PUFA	59.01 ± 1.82	58.48 ± 3.63	Total PUFA	46,41 ± 6,21	-

Table S12. Complete fatty acid profile of all samples (continued).

<i>Polynoidae sp.</i>	Active farm	Control farm	<i>P. stephensonii</i>	Active farm	Control farm
14:0	2.95 ± 0.10	3.11 ± 0.24	14:0	6.40 ± 1.24	8.00 ± 1.20
15:9	1.08 ± 0.09	0.78 ± 0.14	15:9	1.58 ± 0.08	1.60 ± 0.37
16:0	15.47 ± 0.31	13.86 ± 0.17	16:0	18.89 ± 2.14	19.01 ± 2.95
18:0	5.76 ± 0.08	8.06 ± 1.66	18:0	7.12 ± 0.40	7.54 ± 1.17
20:0	0.33 ± 0.04	0.43 ± 0.27	20:0	0.81 ± 0.16	0.74 ± 0.31
22:0	0.33 ± 0.03	0.53 ± 0.31	22:0	0.66 ± 0.08	0.41 ± 0.16
Total saturated	25.92 ± 0.40	26.76 ± 2.13	Total saturated	35.45 ± 1.45	37.29 ± 3.04
16:1n-20	1.61 ± 0.08	1.66 ± 0.41	16:1n-21	3.25 ± 0.62	6.16 ± 2.35
18:1n-9	13.25 ± 1.60	7.60 ± 1.41	18:1n-9	10.85 ± 1.41	3.57 ± 1.18
18:1n-7	2.16 ± 0.08	2.49 ± 0.06	18:1n-7	8.68 ± 1.13	9.49 ± 2.52
20:1n-22	3.66 ± 0.17	5.42 ± 1.09	20:1n-23	3.78 ± 1.07	1.53 ± 0.23
22:1n-22	0.91 ± 0.07	0.26 ± 0.28	22:1n-23	2.06 ± 0.15	0.17 ± 0.03
24:1n-22	0.42 ± 0.03	0.35 ± 0.04	24:1n-23	0.38 ± 0.15	0.43 ± 0.21
Total			Total		
monounsaturated	22.01 ± 1.66	17.78 ± 1.64	monounsaturated	28.99 ± 2.12	21.35 ± 1.26
18:2n-19	4.30 ± 0.39	2.30 ± 1.07	18:2n-20	3.85 ± 0.12	2.01 ± 0.23
18:3n-19	0.09 ± 0.06	0.02 ± 0.03	18:3n-20	0.04 ± 0.07	0.55 ± 0.53
20:2n-19	2.95 ± 0.02	1.75 ± 0.14	20:2n-20	2.85 ± 0.43	1.51 ± 0.12
20:3n-19	0.12 ± 0.01	0.04 ± 0.06	20:3n-20	0.18 ± 0.17	0.75 ± 0.23
20:4n-19	3.56 ± 0.13	3.45 ± 1.23	20:4n-20	9.49 ± 0.64	12.47 ± 2.08
22:2n-19	0.14 ± 0.02	0.00 ± 0.00	22:2n-20	0.04 ± 0.04	0.23 ± 0.20
22:4n-19	1.94 ± 0.15	2.90 ± 1.70	22:4n-20	1.89 ± 0.08	2.56 ± 0.94
Total n-6 PUFA	13.11 ± 0.23	10.45 ± 3.87	Total n-6 PUFA	18.35 ± 0.40	20.07 ± 2.50
18:3n-16	5.69 ± 0.10	4.04 ± 0.18	18:3n-17	0.90 ± 0.43	3.01 ± 1.69
18:4n-16	0.20 ± 0.01	0.34 ± 0.35	18:4n-17	0.16 ± 0.06	0.53 ± 0.49
20:3n-16	0.71 ± 0.04	0.09 ± 0.08	20:3n-17	0.73 ± 0.29	0.31 ± 0.30
20:5n-16	11.09 ± 0.75	14.13 ± 3.32	20:5n-17	7.15 ± 1.02	12.49 ± 2.69
22:5n-16	1.44 ± 0.03	1.95 ± 0.21	22:5n-17	3.68 ± 0.26	2.12 ± 0.51
22:6n-16	19.83 ± 1.24	24.45 ± 1.65	22:6n-17	4.59 ± 0.49	2.83 ± 1.38
Total n-3 PUFA	38.96 ± 1.94	45.00 ± 4.44	Total n-3 PUFA	17.21 ± 0.77	21.29 ± 3.65
Total PUFA	52.07 ± 1.84	55.45 ± 0.97	Total PUFA	35.56 ± 0.70	41.36 ± 2.15

<i>J. rubens</i>	Active farm	Control farm	<i>C. ciliatum</i>	Active farm	Control farm
14:0	5.99 ± 1.35	5.63 ± 0.72	14:0	6.44 ± 0.14	7.68 ± 2.30
15:9	0.83 ± 0.06	0.50 ± 0.20	15:9	0.52 ± 0.15	0.37 ± 0.18
16:0	43.40 ± 3.71	40.47 ± 0.58	16:0	31.68 ± 0.97	28.04 ± 5.72
18:0	4.95 ± 1.17	5.95 ± 1.48	18:0	5.34 ± 1.39	6.45 ± 0.82
20:0	0.35 ± 0.03	0.45 ± 0.10	20:0	0.44 ± 0.02	0.48 ± 0.15
22:0	0.41 ± 0.05	0.34 ± 0.05	22:0	0.56 ± 0.15	0.50 ± 0.16
Total saturated	55.93 ± 3.74	53.34 ± 1.22	Total saturated	44.98 ± 2.11	43.52 ± 7.10
16:1n-22	4.50 ± 1.02	4.84 ± 1.82	16:1n-23	2.88 ± 0.59	8.78 ± 1.76
18:1n-9	6.89 ± 1.35	5.11 ± 0.44	18:1n-9	7.40 ± 0.88	8.07 ± 2.35
18:1n-7	1.58 ± 0.11	1.77 ± 0.54	18:1n-7	3.02 ± 0.57	2.57 ± 0.16
20:1n-24	0.57 ± 0.09	0.46 ± 0.02	20:1n-25	0.50 ± 0.08	0.39 ± 0.11
22:1n-24	0.11 ± 0.09	0.68 ± 0.06	22:1n-25	0.29 ± 0.03	0.00 ± 0.00
24:1n-24	0.37 ± 0.01	0.41 ± 0.04	24:1n-25	0.28 ± 0.02	0.19 ± 0.17
Total			Total		
monounsaturated	14.02 ± 0.60	13.27 ± 1.83	monounsaturated	14.36 ± 0.68	20.00 ± 1.38
18:2n-21	1.95 ± 0.47	1.87 ± 0.21	18:2n-22	3.41 ± 0.53	9.56 ± 4.62
18:3n-21	0.42 ± 0.02	0.27 ± 0.24	18:3n-22	0.60 ± 0.13	0.59 ± 0.28
20:2n-21	0.76 ± 0.03	0.65 ± 0.15	20:2n-22	0.72 ± 0.17	0.56 ± 0.21
20:3n-21	0.56 ± 0.05	0.70 ± 0.03	20:3n-22	0.97 ± 0.15	0.62 ± 0.35
20:4n-21	4.87 ± 0.63	5.60 ± 0.49	20:4n-22	7.40 ± 0.33	5.62 ± 2.73
22:2n-21	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	22:2n-22	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
22:4n-21	0.26 ± 0.05	0.28 ± 0.08	22:4n-22	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.12
Total n-6 PUFA	8.82 ± 1.21	9.37 ± 0.57	Total n-6 PUFA	13.11 ± 0.83	17.02 ± 2.20
18:3n-18	0.45 ± 0.13	2.11 ± 0.64	18:3n-19	2.03 ± 1.74	1.45 ± 0.43
18:4n-18	0.96 ± 0.07	0.41 ± 0.06	18:4n-19	1.91 ± 1.66	0.83 ± 0.41
20:3n-18	0.58 ± 0.05	0.00 ± 0.00	20:3n-19	0.12 ± 0.10	0.00 ± 0.00
20:5n-18	15.47 ± 0.50	19.40 ± 3.63	20:5n-19	19.52 ± 1.02	10.86 ± 1.02
22:5n-18	0.33 ± 0.07	0.32 ± 0.13	22:5n-19	0.33 ± 0.05	0.61 ± 0.28
22:6n-18	3.44 ± 1.25	1.77 ± 0.67	22:6n-19	3.64 ± 0.59	5.71 ± 2.86
Total n-3 PUFA	21.23 ± 1.93	24.02 ± 3.27	Total n-3 PUFA	27.55 ± 1.82	19.46 ± 4.91
Total PUFA	30.05 ± 3.14	33.39 ± 2.72	Total PUFA	40.66 ± 2.56	36.48 ± 6.71

Table S12. Complete fatty acid profile of all samples (continued).

Ulva sp.	Active farm	Control farm	Cladophora sp.	Active farm	Control farm
14:0	17.14 ± 1.01	-	14:0	-	3.16 ± 0.97
15:9	0.21 ± 0.06	-	15:9	-	0.29 ± 0.06
16:0	31.52 ± 3.00	-	16:0	-	40.07 ± 4.69
18:0	2.89 ± 0.26	-	18:0	-	6.20 ± 2.43
20:0	0.16 ± 0.03	-	20:0	-	0.53 ± 0.20
22:0	0.11 ± 0.09	-	22:0	-	0.57 ± 0.13
Total saturated	52.02 ± 3.57	-	Total saturated	-	50.80 ± 2.92
16:1n-24	4.02 ± 0.33	-	16:1n-24	-	2.98 ± 1.00
18:1n-9	21.04 ± 1.39	-	18:1n-9	-	4.19 ± 0.35
18:1n-7	4.09 ± 0.43	-	18:1n-7	-	9.23 ± 0.74
20:1n-26	0.23 ± 0.01	-	20:1n-26	-	0.00 ± 0.00
22:1n-26	0.05 ± 0.08	-	22:1n-26	-	0.00 ± 0.00
24:1n-26	0.23 ± 0.02	-	24:1n-26	-	0.43 ± 0.05
Total	-	-	Total	-	-
monounsaturated	29.65 ± 1.89	-	monounsaturated	-	16.84 ± 1.39
18:2n-23	6.96 ± 1.31	-	18:2n-23	-	11.93 ± 0.89
18:3n-23	0.22 ± 0.03	-	18:3n-23	-	0.20 ± 0.34
20:2n-23	0.19 ± 0.02	-	20:2n-23	-	0.50 ± 0.05
20:3n-23	0.30 ± 0.02	-	20:3n-23	-	0.65 ± 0.20
20:4n-23	1.54 ± 0.13	-	20:4n-23	-	3.45 ± 0.34
22:2n-23	0.00 ± 0.00	-	22:2n-23	-	0.00 ± 0.00
22:4n-23	0.14 ± 0.03	-	22:4n-23	-	0.11 ± 0.20
Total n-6 PUFA	9.35 ± 1.44	-	Total n-6 PUFA	-	16.85 ± 1.89
18:3n-20	3.50 ± 1.54	-	18:3n-20	-	10.97 ± 2.97
18:4n-20	0.20 ± 0.03	-	18:4n-20	-	0.40 ± 0.14
20:3n-20	0.00 ± 0.00	-	20:3n-20	-	0.00 ± 0.00
20:5n-20	3.43 ± 1.04	-	20:5n-20	-	2.58 ± 0.21
22:5n-20	0.65 ± 0.09	-	22:5n-20	-	0.46 ± 0.10
22:6n-20	1.20 ± 0.67	-	22:6n-20	-	1.10 ± 0.39
Total n-3 PUFA	8.98 ± 2.78	-	Total n-3 PUFA	-	15.51 ± 3.50
Total PUFA	18.33 ± 4.15	-	Total PUFA	-	32.36 ± 1.84
Faeces	Active farm	Control farm	Sediment	Active farm	Control farm
14:0	7,94	-	14:0	6.25 ± 0.36	4.49 ± 0.62
15:9	0,55	-	15:9	0.76 ± 0.04	0.90 ± 0.23
16:0	17,62	-	16:0	29.37 ± 0.77	25.19 ± 1.13
18:0	5,56	-	18:0	9.11 ± 0.64	8.34 ± 2.75
20:0	0,41	-	20:0	0.94 ± 0.11	0.85 ± 0.34
22:0	0,27	-	22:0	1.53 ± 0.19	1.20 ± 0.57
Total saturated	32,34	-	Total saturated	47.96 ± 1.25	40.98 ± 4.72
16:1n-24	8,48	-	16:1n-24	5.62 ± 0.39	12.19 ± 3.43
18:1n-9	28,71	-	18:1n-9	23.17 ± 1.31	13.45 ± 3.07
18:1n-7	3,44	-	18:1n-7	3.82 ± 0.20	4.87 ± 0.29
20:1n-26	4,53	-	20:1n-26	3.22 ± 0.25	1.38 ± 0.48
22:1n-26	2,04	-	22:1n-26	0.51 ± 0.03	0.28 ± 0.05
24:1n-26	0,81	-	24:1n-26	0.91 ± 0.08	0.39 ± 0.08
Total	-	-	Total	-	-
monounsaturated	48,01	-	monounsaturated	37.26 ± 1.86	32.56 ± 4.33
18:2n-23	9,71	-	18:2n-23	7.80 ± 0.44	5.34 ± 1.11
18:3n-23	0,18	-	18:3n-23	0.06 ± 0.04	0.24 ± 0.04
20:2n-23	0,55	-	20:2n-23	0.60 ± 0.07	0.34 ± 0.09
20:3n-23	0,12	-	20:3n-23	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.08
20:4n-23	0,34	-	20:4n-23	0.23 ± 0.04	2.32 ± 1.05
22:2n-23	0,09	-	22:2n-23	0.07 ± 0.01	0.00 ± 0.00
22:4n-23	0,05	-	22:4n-23	0.05 ± 0.01	0.22 ± 0.09
Total n-6 PUFA	11,05	-	Total n-6 PUFA	8.90 ± 0.40	8.55 ± 1.12
18:3n-20	0,32	-	18:3n-20	1.04 ± 0.18	1.13 ± 0.18
18:4n-20	0,75	-	18:4n-20	0.28 ± 0.02	0.69 ± 0.11
20:3n-20	0,72	-	20:3n-20	0.48 ± 0.19	0.22 ± 0.04
20:5n-20	2,76	-	20:5n-20	1.95 ± 0.34	8.54 ± 1.28
22:5n-20	0,68	-	22:5n-20	0.32 ± 0.06	0.76 ± 0.37
22:6n-20	3,36	-	22:6n-20	1.82 ± 0.45	6.58 ± 1.26
Total n-3 PUFA	8,60	-	Total n-3 PUFA	5.88 ± 0.83	17.91 ± 2.13
Total PUFA	19,65	-	Total PUFA	14.78 ± 1.16	26.45 ± 2.46

Table S13. Complete fatty acid profile of zooplankton samples.

	N		S	
	Active farm	Control farm	Active farm	Control farm
14:0	6.42 ± 1.46	6.13 ± 0.86	5.66 ± 2.08	6.15 ± 0.66
15:0	1.28 ± 0.15	1.19 ± 0.06	1.17 ± 0.11	1.23 ± 0.08
16:0	22.56 ± 0.70	20.79 ± 0.67	21.61 ± 2.09	21.50 ± 1.04
18:0	7.19 ± 0.61	6.98 ± 0.88	7.61 ± 2.76	6.84 ± 0.90
20:0	0.56 ± 0.05	0.50 ± 0.06	0.54 ± 0.14	0.44 ± 0.07
22:0	0.72 ± 0.11	0.64 ± 0.14	0.59 ± 0.25	0.58 ± 0.17
Total saturated	38.73 ± 2.50	36.23 ± 1.58	37.18 ± 3.89	36.75 ± 1.79
16:1n-7	4.03 ± 0.94	4.48 ± 0.40	4.52 ± 0.92	4.25 ± 0.28
18:1n-9	6.84 ± 0.86	5.97 ± 1.07	7.81 ± 1.55	7.75 ± 2.13
18:1n-7	2.01 ± 0.23	2.31 ± 0.11	2.28 ± 0.18	2.40 ± 0.43
20:1n-9	0.29 ± 0.07	0.30 ± 0.05	0.45 ± 0.20	0.45 ± 0.37
22:1n-9	0.11 ± 0.14	0.07 ± 0.06	0.03 ± 0.04	0.09 ± 0.10
24:1n-9	0.44 ± 0.06	0.49 ± 0.07	0.50 ± 0.12	0.45 ± 0.12
Total monounsaturated	13.72 ± 1.28	13.62 ± 0.86	15.59 ± 2.70	15.39 ± 2.75
18:2n-6	3.34 ± 0.29	2.94 ± 0.21	3.79 ± 1.04	3.49 ± 0.61
18:3n-6	0.15 ± 0.05	0.14 ± 0.10	0.13 ± 0.10	0.14 ± 0.07
20:2n-6	0.32 ± 0.06	0.33 ± 0.04	0.44 ± 0.12	0.33 ± 0.08
20:3n-6	0.20 ± 0.04	0.24 ± 0.06	0.23 ± 0.04	0.19 ± 0.01
20:4n-6	1.84 ± 0.66	2.11 ± 0.38	1.82 ± 0.35	1.69 ± 0.23
22:2n-6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.05
22:4n-6	0.31 ± 0.32	0.19 ± 0.04	0.16 ± 0.05	0.11 ± 0.02
Total n-6 PUFA	6.16 ± 0.78	5.96 ± 0.48	6.57 ± 1.12	5.99 ± 0.43
18:3n-3	1.11 ± 0.13	1.29 ± 0.27	1.46 ± 0.64	1.36 ± 0.13
18:4n-3	0.87 ± 0.09	1.22 ± 0.31	1.12 ± 0.33	0.99 ± 0.11
20:3n-3	0.08 ± 0.06	0.08 ± 0.02	0.02 ± 0.03	0.12 ± 0.12
20:5n-3	14.20 ± 1.45	15.17 ± 1.54	14.13 ± 2.87	15.67 ± 2.22
22:5n-3	0.67 ± 0.32	0.57 ± 0.13	0.65 ± 0.26	0.46 ± 0.05
22:6n-3	24.45 ± 1.38	25.85 ± 1.48	23.28 ± 5.78	23.27 ± 3.27
Total n-3 PUFA	41.39 ± 2.90	44.19 ± 1.58	40.65 ± 6.67	41.86 ± 4.90
Total PUFA	47.55 ± 3.52	50.15 ± 1.81	47.22 ± 6.51	47.85 ± 4.50

References

A

Ackman RG. 1989. Nutritional composition of fats in sea foods. *Progress in food and nutrition science* 13: 161-241

Adams SM. 1999. Ecological role of lipids in the health and success of fish populations. pp 132-160. In: *Lipids in freshwater ecosystems*. Arts MT, Wainman BC (Eds). Springer-Verlag, New York

Alasalvar C, Taylor KDA, Zubcov E, Shahidi F, Alexis M. 2002. Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chemistry* 79: 145-150

Alexander JW. 1998. Immunonutrition: The role of ω -3 fatty acids. *Nutrition* 14: 627-633

Alfaro AC, Thomas F, Sergent L, Duxbury M. 2006. Identification of trophic interactions within an estuarine food web (northern New Zealand) using fatty acid biomarkers and stable isotopes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 70: 271-286

Almaida-Pagán PF, Hernández MD, García García B, Madrid JA, De Costa J, Mendiola P. 2007. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils on n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid desaturation and elongation in sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo*) hepatocytes and enterocytes. *Aquaculture* 272: 589-598

Almansa E, Pérez MJ, Cejas JR, Badía P, Villamandos JE, Lorenzo A. 1999. Influence of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) dietary fatty acids on egg quality and egg fatty acid composition throughout the spawning season. *Aquaculture* 170:323-336

Almansa E, Martián MV, Cejas JR, Badi P, Jerez S, Lorenzo A. 2001. Lipid and fatty acid composition of female gilthead seabream during their reproductive cycle: effects of a diet lacking n-3 HUFA. *Journal of Fish Biology* 59(2): 267-286

Alvarez-Lajonchère L. 2006. Nutrición de reproductores en peces marinos. pp 1-19. In: *Avances en nutrición acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 15-17 Noviembre. Cruz Suárez LE, Rique Marie D, Tapia salazar M et al. (Eds). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

Anderson MJ, Robinson J. 2003. Generalized discriminant analysis based on distances. *Australian & New Zealand Journal of Statistics* 73: 85-113

Anderson MJ. 2004. A FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance (for any two-factor ANOVA design) using permutation tests. Department of Statistics, University of Auckland, New Zealand

Arechavala-Lopez P, Uglem I, Sanchez-Jerez P, Fernandez-Jover D, Bayle-Sempere JT, Nilsen R. 2010. Movements of grey mullet *Liza aurata* and *Chelon labrosus* associated with coastal fish farms in the western Mediterranean Sea. *Aquaculture Environmental Interactions* 1: 127-136

Arechavala-Lopez P, Sanchez-Jerez P, Bayle-Sempere J, Fernandez-Jover D, Martinez-Rubio L, Lopez-Jimenez JA, Martinez-Lopez FJ. 2011. Direct interaction between wild fish aggregations at fish farms and fisheries activity at fishing ground: a case study with *Boops boops*. *Aquaculture Research* 42: 996-1010

Arechavala-Lopez P, Izquierdo-Gomez D, Uglem I, Sanchez-Jerez P. 2014. Aggregations of bluefish *Pomatomus saltatrix* (L.) at Mediterranean coastal fish farms: seasonal presence, daily patterns and influence of farming activity. *Environmental Biology of Fishes* 98: 499-510

Argyropoulou V, Kalogeropoulos N, Alexis MN. 1992. Effect of dietary lipids on growth and tissue fatty acid composition of grey mullet (*Mugil cephalus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 101(1): 129-135

Ashton I, Clements K, Barrow SE, Secombes CJ, Rowley AF. 1994. Effects of dietary fatty acids on eicosanoid-generating capacity, fatty acid composition and chemotactic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1214: 253-262

B

Bachok Z, Mfilinge PL, Tsuchiya M. 2003. The diet of the mud clam *Geloina coaxans* (Mollusca, Bivalvia) as indicated by fatty acid markers in a subtropical mangrove forest of Okinawa, Japan. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 292: 187-197

Barberá C, Fernandez-Jover D, López-Jiménez JA, Gonzalez-Silvera D, Hinz H, Moranta J. 2011. Trophic ecology of the sea urchin *Spatangus purpureus* elucidated from gonad fatty acids composition analysis. *Marine Environmental Research* 71: 235-246

Bayne CJ, Levy S. 1991. Modulation of the oxidative burst in trout myeloid cells by adrenocorticotrophic hormone and catecholamines: mechanisms of action. *Journal of Leukocyte Biology* 50: 554-560

- Bell JG, Dick JR, Sargent JR, McVicar AH.** 1992. Dietary linoleic acid affects phospholipid fatty acid composition in heart and eicosanoid production by cardiomyocytes from atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 103: 337-342
- Bell RM, Hannun YA, Merrill AH Jr (Eds).** 1993. *Advances in lipid research: Sphingolipids and their metabolites*. Vols. 25 and 26. Academic Press, Orlando, FL.
- Bell MV, Batty RS, Dick JR, Fretwell K, Navarro JC, Sargent JR.** 1995. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids* 30: 443-449
- Bell JG, Ashton I, Secombes CJ, Weitzel BR, Dick JR, Sargent JR.** 1996. Dietary lipid affects phospholipid fatty acid compositions, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 54(3): 173-182
- Bell JG, Sargent JR.** 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218: 491-499
- Bell JG, Tocher DR, Henderson J, Dick JR, Cramton VO.** 2003. Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *The Journal of Nutrition* 133: 2793-2801
- Bell MV, Tocher DR.** 2009. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. In: Arts MT, Brett MT, Kainz MJ (Eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer, New York, pp. 211-236
- Betancor MB, Sprague M, Usher S, Sayanova O, Campbell PJ, Napier JA, Tocher DR.** 2015. A nutritionally-enhanced oil from transgenic *Camelia sativa* effectively replaces fish oil as a source of eicosapentaenoic acid for fish. *Scientific Reports* 5: 8104 doi: 10.1038/srep08104
- Black KD.** 2001. *Environmental impacts of aquaculture*. Academic Press, Sheffield
- Black KD, Calder LA, Nikell TD, Sayer MDJ, Orr H, Brand T, Cook EJ, Magill SH, Katz T, Eden N, Jones KJ, Tsapakis M, Angel D.** 2012. Chlorophyll, lipid profiles and bioturbation in sediments around a fish cage farm in the Gulf of Eilat, Israel. *Aquaculture* 356-357: 317-327
- Boland LM, Drzewiecki MM.** 2008. Polyunsaturated fatty acid modulation of voltage-gated ion channels. *Cell Biochemistry and Biophysics* 52: 59-84

Bray JR, Curtis JT. 1957. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27: 325-349

Bruce M, Oyen F, Bell G, Asturiano JF, Farndale B, Carrillo M, Zanuy S, Ramos J, Bromage N. 1999. Development of broodstock diets for the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of n-3 and n-6 highly unsaturated fatty acid to reproductive performance. *Aquaculture* 177: 85-97

Bruno MJ, Koeppe RE II, Andersen OS. 2007. Docosahexaenoic acid alters bilayer elastic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 9638- 9643

Bucholtz RH, Tomkiewicz J, Nyengaard JR, Andersen JB. 2013. Oogenesis, fecundity and condition of Baltic herring (*Clupea harengus* L.): A stereological study. *Fisheries Research* 145: 100-113

Budge SM, Parrish CC, Mckenzie CH. 2001. Fatty acid composition of phytoplankton, settling particulate matter and sediments at a sheltered bivalve aquaculture site. *Marine Chemistry* 76: 285-303

Budge SM, Iverson SJ, Koopman HN. 2006. Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: a primer on analysis and interpretation. *Marine Mammal Science* 22: 759-801

C

Calder PC, Bond JA, Harvey DJ, Gordon S, NewsHolme EA. 1990. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochemical Journal* 269(3): 807-814

Calder PC. 2001. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tail? *Nutrition Research* 21: 309-341

Calder PC. 2006. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 75: 196-202

Calder PC. 2007. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 77: 327-335

Calder PC. 2013. n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. *Proceedings of the Nutrition Society* 72: 326-335

Cancemi G, De Falco G, Pergent G. 2003. Effects of organic matter input from a fish farming facility on a *Posidonia oceanica* meadow. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 56: 961-968

Carboni S, Hughes AD, Atack T, Tocher DR, Migaud H. 2013. Fatty acid profiles during gametogenesis in sea urchin (*Paracentrotus lividus*): Effects of dietary inputs on gonad, egg and embryo profiles. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular & Integrative Physiology* 164: 376-382

Cejas JR, Almansa E, Villamandos JE, Badía P, Bolaños A, Lorenzo A. 2003. Lipid and fatty acid compositions of ovaries from wild fish and ovaries and eggs from captive fish of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture* 216: 299-313

Chrast R, Saher G, Nave KA, MHG Verheijen. 2011. Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models. *Journal of Lipid Research* 52: 419-434

Christie WW. 2003. *Lipid analysis*. 3rd Edition. The Oily Press, Bridgewater, UK. pp. 205–224

Clarke KR. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18: 117-143

Clarke KR, Gorley RN. 2006. *Primer v6: User Manual/Tutorial*. PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK

Claustre H, Marty JC, Cassiani L, Dagaut J. 1988. Fatty acid dynamics in phytoplankton and microzooplankton communities during a spring bloom in the coastal Ligurian Sea: ecological implications. *Marine Microbial Food Webs* 3: 51-66

Cook EJ, Bell MV, Black KD, Kelly MS. 2000. Fatty acid compositions of gonadal material and diets of the sea urchin, *Psammechinus miliaris*: trophic and nutritional implications. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 255: 261-274

Cook HW, McMaster CR. 2002. Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (4th Edn.). Vance DE and Vance JE (Eds.) pp 181-204

Copeman LA, Parrish CC. 2003. Marine lipids in a cold coastal ecosystem: Gilbert Bay, Labrador. *Marine Biology* 143: 1213-1227

Cossins AR, MacDonald AG. 1989. The adaptation of biological membranes to temperature and pressure: fish from the deep and cold. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 21: 115-135

D

Dalsgaard J, St John M, Kattner G, Müller-Navarra D, Hagen W. 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in Marine Biology* 46: 225-340

D'Amours O, Archambault P, McKindsey CW, Johnson LE. 2008. Local enhancement of epibenthic macrofauna by aquaculture activities. *Marine Ecology Progress Series* 371: 73-84

De Silva SS, Francis DS, Tacon AGJ. 2010. Fish oils in aquaculture. pp.1-20. In: Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. Turchini GM, Ng WK, Tocher DR (Eds) CRC Press, Boca Raton, FL

Della Santina P, Sonni C, Sartoni G, Chelazzi G. 1993. Food availability and diet composition of three coexisting Mediterranean limpets (*Patella spp.*). *Marine Biology* 116: 87-95

Dempster T, Sanchez-Jerez P, Bayle-Sempere JT, Giménez-Casalduero F, Valle C. 2002. Attraction of wild fish to sea-cage fish farms in the south-western Mediterranean Sea: spatial and short-term temporal variability. *Marine Ecology Progress Series* 242: 237-252

Dempster T, Sanchez-Jerez P, Bayle-Sempere J, Kingsford M. 2004. Extensive aggregations of wild fish at coastal sea-cage fish farms. *Hydrobiologia* 525: 245-248

Dempster T, Uglem I, Sanchez-Jerez P, Fernandez-Jover D, Bayle-Sempere J, Nilsen R, Bjørn PA. 2009. Coastal salmon farms attract large and persistent aggregations of wild fish: an ecosystem effect. *Marine Ecology Progress Series* 385: 1-14

Dempster T, Sanchez-Jerez P, Uglem I, Bjørn PA. 2010. Species-specific patterns of aggregation of wild fish around fish farms. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 86: 271-275

Dempster T, Sanchez-Jerez P, Fernandez-Jover D, Bayle-Sempere JT, Nilsen R, Bjørn PA, Uglem I. 2013. Proxy measures of fitness suggest coastal fish farms can act as population sources and not ecological traps for wild gadoid fish. *PLoS One* 6(1): e15646. doi:10.1371/journal.pone.0015646

Diaz-Rosales P, Salinas I, Rodríguez A, Cuesta A, Chabrilón M, Balebona MC, Moriñigo MA, Esteban MA, Meseguer J. 2007. Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish & Shellfish Immunology* 20: 482-492

E

Elsdon TS. 2010. Unraveling diet and feeding histories of fish using fatty acids as natural tracers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 386: 61-68

Esteban MA, Mulero V, Muñoz J, Meseguer J. 1998. Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell and Tissue Research* 293:133-141

F

Fabi G, Manoukian S, Spagnolo A. 2009. Impact of an open-sea suspended mussel culture on macrobenthic community (Western Adriatic Sea). *Aquaculture* 289: 54-63

Falk-Petersen S, Dahl TM, Scott CL, Sargent JR, Gulliksen B, Kwasniewski S, Hop H, Millar R. 2002. Lipid biomarkers and trophic linkages between ctenophores and copepods in Svalbard waters. *Marine Ecology Progress Series* 227: 187-194

Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill Jr AH, Murphy RC, Raetz CHR, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, Shimizu T, Spener F, Meer GV, VanNieuwenhze MS, White SH, Witztum JL, Dennis EA. 2005. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* 46: 839-861

FAO. 2014. The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agricultural Organization, Rome, 2014. 223p

Farkas T, Fodor E, Kitajka K, Halver JE. 2001. Response of fish membranes to environmental temperature. *Aquaculture Research* 32: 645-655

Farndale BM, Bell JG, Bruce MP, Bromage NR, Oyen F, Zanuy S, Sargent JR. 1999. Dietary lipid composition affects blood leucocyte fatty acid compositions and plasma eicosanoid concentrations in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 179: 335-350

Felsing M, Glencross B, Telfer T. 2005. Preliminary study on the effects of exclusion of wild fauna from aquaculture cages in a shallow marine environment. *Aquaculture* 243: 159-174

Fernandez-Gonzalez V, Aguado-Giménez F, Gairin JI, Sanchez-Jerez P. 2013. Exploring patterns of variation in amphipod assemblages at multiple spacial scales: natural variability versus coastal aquaculture effect. *Aquaculture Environments Interactions* 3: 93-105

Fernandez-Gonzalez V, Sanchez-Jerez P. 2014. First occurrence of *Caprella scaura* Templeton, 1836 (Crustacea: Amphipoda) on off-coast fish farm cages in the Mediterranean Sea. *Helgoland Marine Research* 68(1): 187-191

Fernandez-Jover D, Lopez Jimenez JA, Sanchez-Jerez P, Bayle-Sempere J, Gimenez Casalduero F, Martinez Lopez FJ, Dempster T. 2007. Changes in body condition and fatty acid composition of wild Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*, Steindachner, 1868) associated to sea cage fish farms. *Marine Environmental Research* 63: 1-18

Fernandez-Jover D, Sanchez-Jerez P, Bayle-Sempere JT, Valle C, Dempster T. 2008. Seasonal patterns and diets of wild fish assemblages associated with Mediterranean coastal fish farms. *ICES Journal of Marine Sciences* 65: 1153-1160

Fernandez-Jover D, Sanchez-Jerez P, Bayle-Sempere JT, Arechavala-Lopez P, Martinez-Rubio L, Lopez-Jimenez JA, Martinez-Lopez FJ. 2009. Coastal fish farms are settlement sites for juvenile fish. *Marine Environmental Research* 68: 89-96

Fernandez-Jover D, Arechavala-Lopez P, Martinez-Rubio L, Tocher DR, Bayle-Sempere JT, Lopez-Jimenez JA, Martinez-Lopez FJ, Sanchez-Jerez P. 2011. Monitoring the influence of marine aquaculture on wild fish communities: benefits and limitations of fatty acid profiles. *Aquaculture Environment Interactions* 2: 39-47

Fernandez-Jover D, Martinez-Rubio L, Sanchez-Jerez P, Bayle-Sempere JT, Lopez Jimenez JA, Martínez Lopez FJ, Bjørn PA, Uglem I, Dempster T. 2011. Waste feed from coastal fish farms: A trophic subsidy with compositional side-effects for wild gadoids. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 91: 559-568 SANTAPOLA

Fernández-Palacios H, Izquierdo MS, Robaina L, Valencia A, Salhi M, Vergara JM. 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 132: 325-337

Folch J, Lee M, Stanley GA. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509

Fountoulaki E, Vasilaki A, Hurtado R, Grigorakis K, Karacostas I, Nengas I, Rigos G, Kotzamanis Y, Venou B, Alexis MN. 2009. Fish oil substitution by vegetable oils in commercial diets for gilthead seabream (*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 fluctuating water temperatures. *Aquaculture* 289: 317-326

Fuentes A, Fernández-Segovia I, Serra JA, Barat JM. 2010. Comparison of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) quality. *Food Chemistry* 119: 1514-1518

G

Gao QF, Shin PKS, Lin GH, Chen SP, Cheung SG. 2006. Stable isotope and fatty acid evidence for uptake of organic waste by green-lipped mussels *Perna viridis* in a poly - culture fish farm system. *Marine Ecology Progress Series* 317: 273-283

Gjøen T, Obach A, Røsjø C, Helland BG, Rosenlund G, Hvattum E, Ruyter B. 2004. Effect of dietary lipids on macrophage function, stress susceptibility and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry* 30: 149-161

Glencross BD. 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture* 1: 71-124

Goemans B, Ichinotsubo L. 2008. *Marine fish health & feeding handbook*. TFH publications, Neptune City, NJ

Gonzalez-Silvera D, Izquierdo-Gomez D, Fernandez-Gonzalez V, Martínez-López FJ, López-Jiménez JA, Sanchez-Jerez P. 2015. Mediterranean fouling communities assimilate the organic matter derived from coastal fish farms as a new trophic resource. *Marine Pollution Bulletin* 91: 45-53

Graeve M, Kattner G, Hagen W. 1994. Diet-induced changes in the fatty acid composition of Arctic herbivorous copepods: experimental evidence of trophic markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 182: 97-110

Greene DH, Selivonchick DP. 1987. Lipid metabolism in fish. *Progress in Lipid Research* 26: 53-85

Grigorakis K, Alexis MN, Taylor A, Hole M. 2002. Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations. *International Journal of Food Science and Technology* 37:477-484

Grossfield A, Feller SE, Pitman MC. 2006. A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by ω -3 polyunsaturated lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 4888-4893

Guerra-García JM, Martínez-Pita I, Pita ML. 2004. Fatty acid composition of the Caprellidea (Crustacea: Amphipoda) from the Strait of Gibraltar. *Scientia Marina* 68(4): 501-510

Guerra-García JM, Tierno de Figueroa JM. 2009. What do caprellids (Crustacea: Amphipoda) feed on? *Marine Biology* 156: 1881-1890

H

Hall D, Lee SY, Meziane T. 2006. Fatty acids as trophic tracers in an experimental estuarine food chain: Tracer transfer. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 336: 42-53

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98
Available from: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

Harding JM, Mann R. 2001. Diet and habitat use by bluefish, *Pomatomus saltatrix*, in a Chesapeake Bay estuary. *Environmental Biology of Fishes* 60: 401-409

Hardy RW. 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* 41: 770-776

Hauville MR, Rhody NR, Resley MJ, Bell JG, Main KL, Migaud H. 2015. Comparative study of lipids and fatty acids in the liver, muscle and eggs of wild and captive common snook broodstock. *Aquaculture* 446: 227-235

Hazel JR, Williams EE. 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in Lipid Research* 29(3): 167-227

Henderson RJ, Forrest DAM, Black KD, Park MT. 1997. The lipid composition of sealoch sediments underlying salmon cages. *Aquaculture* 158: 69-83

Henriques J, Dick JR, Tocher DR, Bell JG. 2014. Nutritional quality of salmon products available from major retailers in the UK: content and composition of n-3 long chain PUFA. *British Journal of Nutrition* 112: 964-975

Hernández MD, Martínez FJ, Jover M, García García B. 2007. Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diet. *Aquaculture* 263: 159-167

Howell KL, Pond DW, Billett DSM, Tyler PA. 2003. Feeding ecology of deep-sea seastars (Echinodermata: Asteroidea): a fatty acid biomarker approach. *Marine Ecology Progress Series* 255: 193-206

Hwang D, Rhee SH. 1999. Receptor-mediated signaling pathways: potential targets of modulation by dietary fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition* 70: 545-556

Hwang D. 2000. Fatty acids and immune responses – a new perspective in searching for clues to mechanism. *Annual Review of Nutrition* 20: 431-456

I

Iverson SJ, Field C, Bowen WD, Blanchard W. 2004. Quantitative fatty acid signature analysis: a new method of estimating predator diets. *Ecological Monographs* 74: 211-235

Iwama GK. 1991. Interactions between aquaculture and the environment. *Critical Reviews in Environmental Control* 21(2): 177-216

Izquierdo-Gómez D, González-Silvera D, Arechavala-López P, López-Jiménez JÁ, Bayle-Sempere JT, Sánchez-Jerez P. 2015. Exportation of excess feed from Mediterranean fish farms to local fisheries through different targeted fish species. *ICES Journal of Marine Science* 72(3): 930-938

Izquierdo MS, Fernández-Palacios H, Tacon AGJ. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197: 25-42

Izquierdo MS, Montero D, Robaina L, Caballero MJ, Rosenlund G, Ginés R. 2005. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* 250: 431-444

J

Jenski LJ, Stilwell W. 2001. Role of docosahexaenoic acid in determining membrane structure and function. p.41-62. In: *Fatty acids: Physiological and behavioral functions*. Mostofsky DI, Yehuda S, Salem N (Eds). Humana Press. Totowa, New Jersey.

Johansson T, Håkanson L, Borum K, Persson J. 1998. Direct flows of phosphorus and suspended matter from a fish farm to wild fish in Lake Southern Bullaren, Sweden. *Aquacultural Engineering* 17: 111-137

Johns RB, Nichols PD, Perry GJ. 1979. Fatty acid composition of ten marine algae from Australian waters. *Phytochemistry* 18: 799-802

Jump DB, Clarke SD, Thelen A, Liimatta M, Ren B, Badin M. 1996. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Progress in Lipid Research* 35: 227-241

K

Kalantzi I, Karakassis I. 2006. Benthic impacts of fish farming: Meta-analysis of community and geochemical data. *Marine Pollution Bulletin* 52: 484-493

Karakassis I, Tsapakis M, Hatziyanni E, Papadopoulou KN, Plaiti W. 2000. Impact of cage farming of fish on the seabed in three Mediterranean coastal areas. *ICES Journal of Marine Science* 57: 1462-1471

Kattner G, Gercken G, Eberlein K. 1983. Development of lipids during a spring plankton bloom in the northern North Sea: I. Particulate fatty acids. *Marine Chemistry* 14(2): 149-162

Katz T, Herut B, Genin A, Angel DL. 2002. Grey mullets ameliorate organically enriched sediments below a fish farm in the oligotrophic Gulf of Aqaba (Red Sea). *Marine Ecology Progress Series* 234:205-214

Kelley DS, Rudolph IL. 2000. Effect of individual fatty acids of ω -6 and ω -3 type on human immune status and role of eicosanoids. *Nutrition* 16: 143-145

Khotimchenko SV and Vaskovsky VE. 1990. Distribution of C20 polyenoic fatty acids in red macrophytic algae. *Botanica Marina* 33: 525-528

Kiron V, Thawonsuwan J, Panigrahi A, Scharsack JP, Satoh S. 2011. Antioxidant and immune defences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) offered plant oils differing in fatty acid profiles from early stages. *Aquaculture Nutrition* 17: 130-140

Kiron V. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology* 173: 111-133

Kirsch PE, Iverson SJ, Bowen WD, Kerr SR, Ackman RG. 1998. Dietary effects on the fatty acid signature of whole Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55(6): 1378-1386

Koussoroplis AM, Bec A, Perga ME, Koutrakis E, Bourdier G, Desvillettes C. 2011. Fatty acid transfer in the food web of a coastal Mediterranean lagoon: Evidence of high arachidonic acid retention in fish. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 91: 450-461

Koven W, Barr Y, Lutzky S, Ben-Atia I, Weiss R, Harel M, Behrens P, Tandler A. 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 193: 107-122

Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106: 2747- 2757

Kruger MC, Horrobin DF. 1997. Calcium metabolism, osteoporosis and essential fatty acids: a review. *Progress in Lipid Research* 36: 131-151

Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones S, Marra M. 2009. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Research* 19, 1639-1645

L

La Rosa T, Mirto S, Mazzola A, Danovaro R. 2001. Differential responses of benthic microbes and meiofauna to fish-farm disturbance in coastal sediments. *Environmental Pollution* 112: 427-434

Lauritzen L, Hansen HS, Jørgensen MH, Michaelsen KF. 2001. The essentiality of long chain *n*-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progress in Lipid Research* 40: 1-94

Leray C, Nonnotte G, Nonnotte L. 1986. The effect of dietary lipids on the trout erythrocyte membrane. *Fish Physiology and Biochemistry* 1: 27-35

Li Q, Ai Q, Mai K, Xu W, Zheng Y. 2013. A comparative study: *In vitro* effects of EPA and DHA on immune functions of head-kidney macrophages isolated from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Fish & Shellfish Immunology* 35: 933-940

Lorenzen S. 2007. The limpet *Patella vulgata* L. at night in air: effective feeding on *Ascophyllum nodosum* monocultures and stranded seaweeds. *Journal of Molluscan Studies* 73: 267-274

M

Machias A, Labropoulou M. 2002. Intra-specific variation in resource use by red mullet, *Mullus barbatus*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 55: 565-578

Madin J, Chong VC, Basri B. 2009. Development and short-term dynamics of macrofouling assemblages on fish-cage nettings in a tropical estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 83: 19-29

- Maldonado M, Carmona MC, Echeverría Y, Riesgo A.** 2005. The environmental impact of Mediterranean cage fish farms at semi-exposed locations: does it need a re-assessment? *Helgoland Marine Research* 59: 121-135
- Mantzavrakos E, Kornaros M, Lyberatos G, Kaspiris P.** 2007. Impacts of a marine fish farm in Argolikos Gulf (Greece) on the water column and the sediment. *Desalination* 210: 110-124
- Martinez-Garcia E, Sanchez-Jerez P, Aguado-Giménez F, Ávila P, Guerrero A, Sánchez-Lizaso JL, Fernandez-Gonzalez V, González N, Gairin JI, Carballeira C, García-García B, Carreras J, Macías JC, Carballeira A, Collado C.** 2013. A meta-analysis approach to the effects of fish farming on soft bottom polychaeta assemblages in temperate regions. *Marine Pollution Bulletin* 69: 165-171
- Martinez-Rubio L, Morais S, Evensen Ø, Wadsworth S, Ruohonen K, Vecino JLG, Bell JG, Tocher DR.** 2012. Functional feeds reduce heart inflammation and pathology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following experimental challenge with atlantic salmon reovirus (ASRV). *PLoS ONE* 7(11): e40266
- Merril AH Jr, Schmelz EM, Dillehay DL, Spiegel S, Shayman JA, Schroeder JJ, Riley RT, Vos KA, Wang E.** 1997. Sphingolipids – The enigmatic lipid class: Biochemistry, Physiology and Pathophysiology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 142: 208-225
- Meziane T, Tsuchiya M.** 2000. Fatty acids as tracers of organic matter in the sediment and food web of a mangrove/intertidal flat ecosystem, Okinawa, Japan. *Marine Ecology Progress Series* 200: 49-57
- Miles EA, Calder PC.** 1998. Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Proceedings of the Nutrition Society* 57: 277-292
- Minagawa S, Hikima J, Hirono I, Aoki T, Mori H.** 2001. Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 439-445
- Mirto S, La Rora T, Gambi C, Danovaro R.** 2002. Nematode community response to fish-farm impact in the western Mediterranean. *Environmental Pollution* 116: 203-214
- Mnari A, Bouhleb I, Chraief I, Hammami M, Romdhane MS, El Cafsi M, Chaouch A.** 2007. Fatty acids in muscles and liver of Tunisian wild and farmed gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Food Chemistry* 100: 1393-1397

Montero D, Kalinowski T, Obach A, Robaina L, Tort L, Caballero MJ, Izquierdo MS. 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture* 225: 353-370

Montero D, Grasso V, Izquierdo MS, Ganga R, Real F, Tort L, Caballero MJ, Acosta F. 2008. Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Effects on Mx expression and some immune parameters. *Fish & Shellfish Immunology* 24: 147-155

Montero D, Mathlouthi F, Tort L, Afonso JM, Torrecillas S, Fernández-Vaquero A, Negrin D, Izquierdo MS. 2010. Replacement of dietary fish oil by vegetable oils affects humoral immunity and expression of pro-inflammatory cytokines genes in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Fish & Shellfish Immunology* 29: 1073-1081

Moore SA, Yoder E, Spector AA. 1990. Role of the blood-brain barrier in the formation of long-chain ω -3 and ω -6 fatty acids from essential fatty acid precursors. *Journal of Neurochemistry* 55: 391-402

Morote E, Olivar MP, Villate F, Uriarte I. 2008. Diet of round sardinella, *Sardinella aurata*, larvae in relation to plankton availability in the NW Mediterranean. *Journal of Plankton Research* 30(7): 807-816

Mourente G, Tocher DR. 1992. Effects of weaning onto a pelleted diet on docosahexaenoic acid (22:6n-3) levels in brain of developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.)

Mourente G, Tocher DR. 1993. Incorporation and metabolism of ^{14}C -labelled polyunsaturated fatty acids in wild-caught juveniles of golden grey mullet, *Liza aurata*, *in vivo*. *Fish Physiology and Biochemistry* 12: 119-130

Mourente G, Good JE, Bell JG. 2005. Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E_2 and $\text{F}_{2\alpha}$, immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquaculture Nutrition* 11: 25-40

Mourente G, Good JE, Thompson KD, Bell JG. 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: 770-779

Murillo E, Rao KS, Durant AA. 2014. The lipid content and fatty acid composition of four eastern central Pacific native fish species. *Journal of Food Composition and Analysis* 33: 1-5

N

Nakamura MT, Cho HP, Xu J, Tang Z, Clarke SD. 2001. Metabolism and functions of highly unsaturated fatty acids: an update. *Lipids* 36: 961-964

Napolitano GE, Pollero RJ, Gayoso AM, MacDonald BA, Thompson RJ.1997. Fatty acids as trophic markers of phytoplankton blooms in the Bahia Blanca estuary (Buenos Aires, Argentina) and in Trinity Bay (Newfoundland, Canada). *Biochemical Systematics and Ecology* 25(8): 739-755

Naylor RL, Goldbrug RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405: 1017-1024

Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, Chiu A, Elliott M, Farrell AP, Forster I, Gatlin DM, Goldberg RJ, Hua K, Nichols PD. 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 15103-15110

Neuringer M, Anderson GJ, Connor WE. 1988. The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. *Annual Review of Nutrition* 8: 517-541

Nevenzel JC. 1970. Occurrence, function and biosynthesis of wax esters in marine organisms. *Lipids* 5: 308-319

Ng WK, Chong CY, Wang Y, Romano N. 2013. Effects of dietary fish and vegetable oils on the growth, tissue fatty acid composition, oxidative stability and vitamin E content of red hybrid tilapia and efficacy of using fish oil finishing diets. *Aquaculture* 372-375: 97-110

Nichols PD, Petrie J, Singh S. 2010. Long-chain omega-3 oils – An update on sustainable resources. *Nutrients* 2(6): 572-585

Nichols PD, Glencross B, Petrie JR, Singh SP. 2014. Readily available sources of long-chain omega-3 oils: Is farmed Australian seafood a better source of the good oil than wild caught seafood? *Nutrients* 6: 1063-1079

Niu SL, Mitchell DC, Lim SY, Wen ZM, Kim HY, Salem N, Litman BJ. 2004. Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency. *Journal of Biological Chemistry* 279(30): 31098-31104

O

Olsen SA, Ervik A, Grahl-Nielsen O. 2009. Deep-water shrimp (*Pandalus borealis*, Krøyer, 1838) as indicator organism for fish-farm waste. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 381: 82-89

Özogul Y, Özogul F, Alagoz S. 2007. Fatty acid profiles and fat contents of commercially important seawater and freshwater fish species of Turkey: A comparative study. *Food Chemistry* 103: 217-223

P

Parrish CC, Abrajano TA, Budge SM, Helleur RJ, Hudson ED, Pulchan K, Ramos C. 2000. Lipid and phenolic biomarkers in marine ecosystems: analysis and applications. In: Wangersky, P. (Ed.) *The Handbook of Environmental Chemistry, Part D, Marine Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 193-233

Parrish CC, Nichols PD, Pethybridge H, Young JW. 2015. Direct determination of fatty acids in fish tissues: quantifying top predator trophic connections. *Oecologia* 177: 85-95

Pauly D, Christensen V, Guénette S, Pitcher TJ, Sumaila UR, Walters CJ, Watson R, Zeller D. 2002. Towards sustainability in world fisheries. *Nature* 418: 689-695

Peng S, Chen L, Qin JG, 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 schlegeli*. *Aquaculture* 276: 154-161

Pérez MJ, Rodríguez C, Cejas JR, Martín MV, Jerez S, Lorenzo A. 2007. Lipid and fatty acid content in wild white seabream (*Diplodus sargus*) broodstock at different stages of the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 146: 187-196

Pérez O, Almansa E, Riera R, Rodriguez M, Ramos E, Costa J, Monterroso O. 2013. Food and faeces settling velocities of meagre (*Argyrosomus regius*) and its application for modelling waste dispersion from sea cage aquaculture. *Aquaculture* 420-421: 171-179

Perga ME, Bec A, Anneville A. 2009. Origins of carbon sustaining the growth of whitefish *Coregonus lavaretus* early larval stages in Lake Annecy: insights from fatty-acid biomarkers. *Journal of Fish Biology* 74: 2-17

Petursdottir H, Gislason A, Falk-Petersen H, Hop H, Svavarsson J. 2008. Deep-sea Research II 55: 83-93

Phleger CF. 1998. Buoyancy in marine fishes: direct and indirect role of lipids. American Zoologist 38(2): 321-330

Pollierer MM, Scheu S, Haubert D. 2010. Taking it to the next level: Trophic transfer of marker fatty acids from basal resource to predators. Soil Biology and Biochemistry 42: 919-925

Prato E, Biandolino F. 2012. Total lipid content and fatty acid composition of commercially important fish species from the Mediterranean, Mar Grande Sea. Food Chemistry 131: 1233-1239

Q

Qiu X. 2003. Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7, 10, 13, 16, 19): two distinct pathways. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty acids 68: 181-186

Quade MJ, Roth JA. 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. Veterinary Immunology and Immunopathology 58: 239-248

R

Rabanal HR. 1988. History of aquaculture. FAO, Rome.
<http://www.fao.org/docrep/field/009/ag158e/ag158e00.htm>. Accessed July 2015

Rajendran N, Suwa Y, Urushigawa Y. 1993. Distribution of phospholipids ester-linked fatty acids biomarkers for bacteria in the sediment of Ise Bay. Marine Chemistry 42: 39-56

Ramírez B, Montero D, Izquierdo M, Haroun R. 2013. Aquafeed imprint on bogue (*Boops boops*) populations and the value of fatty acids as indicators of aquaculture-ecosystem interaction: are we using them properly? Aquaculture 414-415: 294-302

Rangan VS, Smith S. 2002. Fatty acid synthesis in eukaryotes. In: Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (4th Edn.). Vance DE and Vance JE (Eds.) pp 152-179

Regost C, Arzel J, Robin J, Rosenlund G, Kaushik SJ. 2003. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*) 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture* 217: 465-482

Rodríguez A, Esteban MA, Meseguer J. 2003. Phagocytosis and peroxidase release by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes in response to yeast cells. *The Anatomical Record A: Discoveries in Molecular, cellular, and Evolutionary Biology* 272: 415-423

Rosenlund G, Obach A, Sandberg MG, Standal H, Tveit K. 2001. Effect of alternative lipid sources on long-term growth performance and quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research* 32: 323-328

Rosenlund G, Corraze G, Izquierdo M, Torstensen BE. 2010. The effects of fish oil replacement on nutritional and organoleptic qualities of farmed fish. In: Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. Turchini GM, Ng WK and Tocher DR (Eds) CRC Press, Boca Raton, FL. pp: 487-522

Rowley AF, Knight J, Lloyd-Evans P, Holland JW, Vickers PJ. 1995. Eicosanoids and their role in immune modulation in fish – a brief overview. *Fish and Shellfish Immunology* 5: 549-567

Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 132: 365– 386

Rueda FM, Hernández MD, Egea MA, Aguado F, García B, Martínez FJ. 2001. Differences in tissue fatty acid composition between reared and wild sharpsnout sea bream, *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). *British Journal of Nutrition* 86: 617-622

Ruiz JM, Pérez M, Romero J. 2001. Effects of fish farms loadings on seagrass (*Posidonia oceanica*) distribution, growth and photosynthesis. *Marine Pollution Bulletin* 42: 749-760

Russo GL. 2009. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical Pharmacology* 77: 937-946

S

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method. A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425

Salinas I, Abelli L, Bertoni F, Picchietti S, Roque A, Furones D, Cuesta A, Meseguer J, Esteban MA. 2008. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 25: 114-223

Samuelson OB, Ervik A, Solheim E. 1988. A qualitative and quantitative analysis of the sediment gas and diethyl - ether extract of the sediment from salmon farms. *Aquaculture* 74: 277-285

Sanchez-Jerez P, Fernandez-Jover D, Bayle-Sempere J, Valle C, Dempster T, Tuya F, Juanes F. 2008. Interactions between bluefish *Pomatomus saltatrix* (L.) and coastal sea-cage farms in the Mediterranean Sea. *Aquaculture* 282: 61-67

Sanchez-Jerez P, Fernandez-Jover D, Uglem I, Arechavala-Lopez P, Dempster T, Bayle-Sempere J, Valle-Perez C, Izquierdo D, Bjørn P, Nilsen R. 2011. Coastal fish farms as fish aggregations devices (FADs). p.187-208. In: *Artificial reefs in fisheries management*. S.A. Bortone, F. Pereira-Brandini, G. Fabi, S. Otake (Eds.) CRC Press. Taylor & Francis Group. Florida U.S. 350p.

Sanz-Lázaro C, Belando MD, Marín-Guirao L, Navarrete-Mier F, Marín A. 2011(a). Relationship between sedimentation rates and benthic impact on Maërl beds derived from fish farming in the Mediterranean. *Marine Environmental Research* 71: 22-30

Sanz-Lázaro C, Marín A. 2011(b). Diversity patterns of benthic macrofauna caused by marine fish farming. *Diversity* 3: 176-199

Sara G, Scilipoti D, Mazzola A, Modica A. 2004. Effects of fish farming waste to sedimentary and particulate organic matter in a southern Mediterranean area (Gulf of Castellammare, Sicily): A multiple stable isotope study (d13C and d15N). *Aquaculture* 234: 199-213

Sargent J, McEvoy L, Estevez A, Bell G, Bell M, Henderson J, Tocher D. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179: 217-229

Sargent JR, Tocher DR, Bell JG. 2002. The lipids. p.181-257. In: *Fish nutrition*. Halver JE (Ed) San Diego: Academic press.

Schmidt A, Wolde M, Thiele C, Fest W, Kratzin H, Podtelejnikov AV, Witke W, Huttner WB, Soling HD. 1999. Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 401: 133-141

Schmitz G, Ecker J. 2008. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research* 47: 147-155

Schulz H. 2002. Oxidation of fatty acids in eukaryotes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (4th Edn.). Vance DE and Vance JE (Eds.) pp 127- 150

Scott CL, Falk-Petersen S, Sargent JR, Hop H, Lønne OJ, Poltermann M. 1999. Lipids and trophic interactions of ice fauna and pelagic zooplankton in the marginal ice zone of the Barents Sea. *Polar Biology* 21: 65-70

Seierstad SL, Haugland Ø, Larsen S, Waagbø R, Evensen Ø. 2009. Pro-inflammatory cytokine expression and respiratory burst activity following replacement of fish oil with rapeseed oil in the feed for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 289: 212-218

Serhan CN. 2005. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 73: 141-162

Shepherd CJ, Pike IH, Barlow SM. 2005. Sustainable feed resources of marine origin. *EAS Special Publication* 35, pp. 59-66

Sheridan MA. 1988. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology part B: Comparative Biochemistry* 90: 679-690

Shin PKS, Yip KM, Xu WZ, Wong WH, Cheung SG. 2008. Fatty acid as markers to demonstrating trophic relationships among diatoms, rotifers and green-lipped mussels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 357: 75-84

Silva-Carrillo Y, Hernández C, Hardy RW, González-Rodríguez B, Castillo-Vargasmachuca S. 2012. The effect of substituting fish meal with soybean meal on growth, feed efficiency, body composition and blood chemistry in juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture* 364-365: 180-5

Simopoulos AP. 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 70: 560s-569s

Simopoulos AP. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56: 365-379

Skog TE, Hylland K, Torstensen BE, Berntssen MHG. 2003. Salmon farming affects the fatty acid composition and taste of wild saithe *Pollachius virens* L. *Aquaculture Research* 34: 999-1007

- Sley A, Jarboui O, Ghorbel M, Bouain A.** 2008. Diet composition and food habits of *Caranx rhonchus* (Carangidae) from the Gulf of Gabes (central Mediterranean). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 88(4): 831-836
- Sliskovic M, Jelic-Mrcelic G, Antolic B, Anicic I.** 2011. The fouling of fish farm cage nets as bioindicator of aquaculture pollution in the Adriatic Sea (Croatia). *Environmental Monitoring and Assessment* 173: 519-532
- Soengas JL, Aldegunde M.** 2002. Energy metabolism of fish brain. *Comparative Biochemistry and Physiology part B* 131: 271-296
- Sorensen PW, Hara TJ, Stacey NE, Goetz FW.** 1998. F prostaglandins function as potent olfactory stimulants that comprise the postovulatory female sex pheromone in goldfish. *Biology of Reproduction* 39: 1039-1050
- Spector R.** 1988. Fatty acid transport through the blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry* 50: 639-643
- Sprecher H, Luthria DL, Mohammed BS, Baykousheva SP.** 1995. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Lipid Research* 36: 2471-2477
- Steffens W.** 1997. Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans. *Aquaculture* 151: 97-119
- Stickney RR, Treece GD.** 2012. History of Aquaculture. In: *Aquaculture production systems*. Tidwell JH (Ed.) Wiley-Blackwell, Oxford, UK. pp 15-50
- Stillwell W, Wassall SR.** 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chemistry and Physics of Lipids* 126: 1-27
- Stoknes IS, Økland HMW, Falch E, Synnes M.** 2004. Fatty acid and lipid class composition in eyes and brain from teleosts and elasmobranchs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 138: 183-191
- Stulnig TM, Zeyda M.** 2004. Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: Impact on T-cell signaling. *Lipids* 39: 1171-1175
- Sugimoto Y, Narumiya S.** 2007. Prostaglandin E receptors. *Journal of Biological Chemistry* 282(16):1613-11617
- Sun MY, Shi W, Lee RF.** 2000. Lipid-degrading enzyme activities associated with distribution and degradation of fatty acids in the mixing zone of Altamaha estuarine sediments. *Organic Geochemistry* 31: 889-902

Sunyer JO, Tort L. 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 45: 333-345

T

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2715-2729

Tocher DR. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* 11(2): 107-184

Tocher DR, Bendiksen EÅ, Campbell PJ, Bell JG. 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture* 280: 21-34

Tocher DR. 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research* 41: 717-732

Tocher DR. 2015. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture in press*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.010>

Tomassetti P, Persia E, Mercatali I, Vani D, Marusso V, Porrello S. 2009. Effects of mariculture on macrobenthic assemblages in a western mediterranean site. *Marine Pollution Bulletin* 58: 533-541

Trichet VV. 2010. Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research* 41: 356-372

Tur JA, Bibiloni MM, Sureda A, Pons A. 2012. Dietary sources of omega 3 fatty acids: public health risks and benefits. *British Journal of Nutrition* 107: s23-s52

Turchini GM, Torstensen BE, Ng WK. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture* 1: 10-57

Turchini GM, Ng WK, Tocher DR (eds) (2010) *Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds*. CRC Press, Boca Raton, FL

Tuya F, Sanchez-Jerez P, Dempster T, Boyra A, Haroun R. 2006. Changes in demersal wild fish aggregations beneath a sea-cage fish farm after the cessation of farming. *Journal of Fish Biology* 69: 682-697

U

Uglem I, Dempster T, Bjørn PA, Sanchez-Jerez P, Økland F. 2009. High connectivity of salmon farms revealed by aggregation, residence and repeated movements of wild fish among farms. *Marine Ecology Progress Series* 384: 251-260

V

Van Biesen G, Parrish CC. 2005. Long-chain monounsaturated fatty acids as biomarkers for the dispersal of organic waste from a fish enclosure. *Marine Environmental Research* 60(3): 375-388

Vita R, Marin A, Madrid JA, Jiménez-Brinquis B, Cesar A, Marin-Guirao L. 2004. Effects of wild fishes on waste exportation from a Mediterranean fish farm. *Marine Ecology Progress Series* 277: 253-261

W

Wangensteen OS, Turon X, García-Cisneros A, Recasens M, Romero J, Palacin C. 2011. A wolf in sheep's clothing: carnivory in dominant sea urchins in the Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series* 441: 117-128

Wannigama GP, Volkman JK, Gillan FT, Nichols PD, Johns RB. 1981. A comparison of lipid components of the fresh and dead leaves and pneumatophores of the mangrove *Avicennia marina*. *Phytochemistry* 20: 659-666

Warwick RM, Platt HM, Clarke KR, Agard J, Gobin J. 1990. Analysis of macrobenthic and meiobenthic community structure in relationship to pollution and disturbance in Hamilton Harbour, Bermuda. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 138: 119-142

Watanabe T. 2002. Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries Science* 68: 242-252

Wu FC, Ting YY, Chen HY. 2003. Dietary docosahexaenoid acid is more optimal than eicosapentaenoic acid affecting the level of cellular defence responses of the juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. *Fish & Shellfish Immunology* 14: 223-238

Y

Yaqoob P. 2003. Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. *Trends in Immunology* 24: 639-645

Yeagle PL. 1985. Cholesterol and the cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Biomembranes* 822: 267-287

Z

Zuckermandl E, Pauling L. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. pp. 97-166. In: *Evolving Genes and Proteins*. Bryson V, Vogel HJ (Eds) Academic Press, New York

Resumen en español

Introducción

La acuicultura ha crecido rápidamente durante las últimas décadas, lo que ha llevado a tener cada vez en más consideración el posible impacto ambiental de esta industria y sus consecuencias sobre el medio marino. Una de las más importantes es el aporte de grandes cantidades de materia orgánica al medio, en forma de excedente de pienso y heces, que generan una acumulación de desechos solubles y particulados. Los piensos utilizados para alimentar a los peces cultivados contienen grandes cantidades de aceites de origen vegetal, que sustituyen parcialmente a los aceites de pescado utilizados tradicionalmente, convirtiéndose en una alternativa más económica y sostenible. Estos aceites vegetales son ricos en ácidos grasos de la serie n-6, mientras que son muy escasos en ácidos grasos de la serie n-3 (abundantes en peces marinos).

Las jaulas de las piscifactorías atraen a una gran multitud de peces y macroinvertebrados que buscan protección en la estructura sumergida, y que además utilizan la materia orgánica vertida al medio como recurso trófico. Debido a la composición lipídica de estos piensos, estos se convierten en una gran fuente de ácidos grasos de origen vegetal como el ácido linoleico, los cuales se acumulan y podrán desplazar a los ácidos grasos n-3, abundantes en sus dietas naturales y con un importante papel fisiológico. Debido a la composición característica de los piensos, los ácidos grasos pueden ser utilizados como marcadores del consumo de desechos de la acuicultura por parte de la fauna salvaje agregada.

Objetivos

Es de esperar que se produzcan cambios en el perfil de ácidos grasos de los especímenes agregados, lo que podría tener un efecto sobre su fisiología y estado de salud. El objetivo general de esta tesis fue investigar los efectos de la ingesta de residuos de la acuicultura en el perfil de ácidos grasos de la fauna marina agregada a las piscifactorías, utilizando para ello ácidos grasos de origen vegetal como marcadores de consumo de pienso comercial.

Los objetivos específicos de esta tesis fueron:

1 – Comprobar el posible efecto del consumo de residuos de la acuicultura en diferentes tejidos de distintas especies de peces salvajes agregados a las piscifactorías.

1.1 – El uso de ácidos grasos como marcadores para evaluar el grado de consumo de residuos de la acuicultura por parte de peces salvajes, teniendo en cuenta la distancia a jaulas de piscifactoría.

1.2 – Comprobar el efecto en el perfil de ácidos grasos de peces de distinto nivel trófico.

1.3 – Evaluar la transmisión presa-depredador de ácidos grasos de origen vegetal.

1.4 – Valorar los posibles efectos en la reproducción de peces salvajes.

1.5 – Modificación de los perfiles de ácidos grasos en diferentes compartimentos ecológicos centrándose en macroinvertebrados marinos.

1.6 – Modificación de los perfiles de ácidos grasos en sedimentos bajo las jaulas.

2 – Investigar, en condiciones de laboratorio, el efecto de un cambio del consumo de una dieta natural a un pienso comercial, en el perfil de ácidos grasos de peces salvajes capturados.

2.1 – Elucidar la magnitud y la tasa de cambio de ácidos grasos vegetales en diferentes tejidos.

2.2 – Valorar posibles efectos en la salud de los peces debido al cambio de dieta.

Capítulos experimentales

Capítulo 1

El objetivo de este estudio fue comprobar la idoneidad del uso de ácidos grasos de origen vegetal como marcadores del consumo de piensos en peces agregados a las piscifactorías, analizando sus diferentes patrones de acumulación y su persistencia en diferentes tejidos de juveniles de *Liza aurata* (Risso, 1810). Se sustituyó su dieta natural por un pienso comercial, seguido de un retorno al consumo de dieta natural (periodo de

lavado). Los perfiles de ácidos grasos de músculo, hígado y cerebro se vieron modificados tras dos meses de consumo de pienso comercial, mientras que dos meses de lavado no fueron suficientes para que se recuperaran sus valores originales, siendo el cerebro particularmente resistente a los cambios. El hexamen histológico del hígado no mostró alteraciones de la distribución de gotas lipídicas o en el contenido de grasa almacenada. Se recomienda el uso combinado de músculo y cerebro para análisis de ácidos grasos cuando se pretende rastrear el consumo de residuos de la acuicultura en forma de excedente de pienso por parte de peces salvajes.

Capítulo 2

La mayoría de peces carnívoros requieren la presencia de ácidos grasos n-3 de cadena larga en su dieta, ya que son incapaces de obtenerlos en cantidad suficiente a partir de la elongación y desaturación de sus precursores. El consumo sin control de piensos comerciales por parte de los peces salvajes agregados a piscifactorías conlleva una acumulación de ácidos grasos de origen vegetal en diversos tejidos, los cuales presentan una disminución en la relación n-3/n-6 cuando se comparan sus perfiles con los de peces control. Las cantidades relativas de ácidos grasos presentan una gran influencia sobre la regulación del metabolismo lipídico, sistema inmunitario y reproductor, debido a su interacción con diversos tipos de receptores que regulan la expresión de genes relacionados. Hoy en día, el análisis de expresión génica mediante qPCR se ha convertido en una herramienta útil para estudiar los cambios que se producen a este nivel en respuesta a determinados estudios. La técnica requiere el uso de primers adecuados para los genes de estudio.

Este capítulo describe la metodología empleada para la obtención de secuencias adecuadas para el análisis de expresión génica de elongasa 5 y $\Delta 6$ desaturasa en *Liza aurata*, especie que presenta un conocido comportamiento de agregación a las jaulas, y que ha sido objeto de estudio en el capítulo anterior. La obtención de las secuencias adecuadas permite su uso para futuros análisis sobre el efecto del consumo de materia orgánica procedente de las piscifactorías en la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico.

Capítulo 3

El consumo de piensos comerciales en forma de excedente de pienso puede modificar la relación de ácidos grasos n-3/n-6 en los peces salvajes agregados a las piscifactorías, debido al alto contenido de ácidos grasos de origen vegetal en los pellets. Los ácidos grasos influyen en la fluidez y otras propiedades de las membranas celulares, incluyendo a leucocitos, y también son precursores de eicosanoides, los cuales tienen un papel importante en diversas funciones inmunes. Este estudio pretende simular, en condiciones de laboratorio, las posibles respuestas de peces salvajes que llegan por primera vez a los alrededores de las jaulas de una piscifactoría, los cuales modifican su dieta natural por el consumo de pienso comercial. Por lo tanto, se valoraron el perfil de ácidos grasos y varios parámetros inmunológicos de mújol (*Liza aurata*), con el fin de comprobar los efectos que debe tener tal cambio en la dieta. Los resultados demostraron que el perfil de ácidos grasos del músculo de especímenes de mújol se vió alterado tras dos semanas de consumo de pienso, presentando un incremento en el porcentaje de ácidos grasos de origen vegetal y viéndose modificada la relación n-3/n-6. En relación a los parámetros inmunológicos, la peroxidasa en suero, la actividad bactericida, y la capacidad fagocítica de leucocitos de riñón cefálico se incrementaron tras 8 semanas consumiendo la nueva dieta, mientras que la actividad del estallido respiratorio de los leucocitos se vió disminuida. Los resultados sugieren que los porcentajes de ácidos grasos en la dieta modifican la relación n-3/n-6 presentando un efecto inmunomodulador en peces. Se requiere más investigaciones para un mejor entendimiento de los posibles efectos a largo plazo del cambio de a una dieta comercial en poblaciones de peces salvajes cercanas a las jaulas de piscifactoría.

Capítulo 4

Se capturaron cuatro especies de peces salvajes, con distintos hábitos alimentarios, a diferentes distancias de una piscifactoría: a) peces capturados en los alrededores de las jaulas; b) peces capturados mediante pesca artesanal a un mínimo de 1,5 km de las jaulas; y c) peces capturados mediante técnicas de arrastre, a un mínimo de 5 km de las jaulas. Se analizó el perfil de ácidos grasos en músculo, cerebro, hígado y gónadas. Los peces asociados a las jaulas de la piscifactoría mostraron en todos sus tejidos acumulación de ácidos grasos de origen vegetal, debido al consumo de excedente de

pienso, o por depredación de presas que se alimentan de pienso comercial, siendo los peces capturados a mayor distancia los que presentaron un perfil de ácidos grasos menos influenciado por las actividades acuícolas. La histología de las gónadas de *M. barbatus* mostró una aceleración de las etapas finales del desarrollo de los oocitos, en los peces capturados en los alrededores de las jaulas comparados con peces sin que se encontraran efectos negativos aparentes asociados al consumo de desechos de la acuicultura.

Capítulo 5

Hoy en día, la composición lipídica de los piensos comerciales incluye grandes cantidades de aceites vegetales terrestres, ricos en ácidos grasos n-6 y pobres en ácidos grasos n-3. Las piscifactorías aportan materia orgánica al medio, en forma de fragmentos de pellets y heces que podrían ser ingeridos por la fauna local atraída a la estructura sumergida de las instalaciones de acuicultura, o que vive en hábitats bénticos naturales. Los ácidos grasos contenidos en los pellets se utilizaron como marcadores tróficos con el fin de arrojar luz sobre la asimilación e incorporación de los desechos de la acuicultura por parte de las poblaciones de invertebrados asociados a las jaulas. Dieciocho especies de macroinvertebrados, así como zooplankton, algas y sedimentos, fueron recolectados en dos piscifactorías, una de las cuales (control) permaneció en desuso durante los dos años previos al muestreo. Este estudio demuestra que las poblaciones de macroinvertebrados utilizan la materia orgánica procedente de las granjas. Se requerirían más investigaciones a la hora de valorar las implicaciones potenciales de la producción en acuicultura para el ecosistema circundante.

Conclusiones

Las principales conclusiones de esta tesis son:

1. Dos semanas de consumo de pienso comercial son suficientes para que se modifique el perfil de ácidos grasos del músculo en las especies estudiadas. Dos meses de periodo de lavado tras dos meses de consumo de pienso comercial no

es tiempo suficiente para recuperar los perfiles originales de ácidos grasos en músculo, cerebro e hígado.

2. El consumo de pienso comercial durante un periodo de tiempo de dos meses no mostró influencia en la estructura histológica del hígado así como en la distribución de gotas lipídicas.
3. Se recomienda el uso combinado de músculo y cerebro para obtener una historia completa sobre la alimentación de peces salvajes.
4. El cambio en la dieta que se produce cuando los peces llegan por primera vez a los alrededores de las jaulas debe modular algunos parámetros inmunológicos, sin que se observen efectos negativos asociados al cambio a un consumo de pienso comercial.
5. Peces salvajes agregados a jaulas, con diferentes hábitos alimentarios, acumulan ácidos grasos de origen vegetal en músculo, cerebro, hígado y gónadas, a través del consumo de excedente de pienso o por depredación de presas que han consumido pienso comercial. Esos efectos pueden estar presentes, en menor magnitud, en peces capturados a mayores distancias de las piscifactorías (mínimo 1,5 km).
6. El ovario de *M. barbatus* asociado a piscifactorías presenta una aceleración de las etapas finales del desarrollo oocitario, sin aparentes efectos negativos.
7. Las actividades acuícolas influyen en los perfiles de ácidos grasos de los sedimentos, de algas y de la mayoría de las especies de macroinvertebrados asociadas a las estructuras de las jaulas de las piscifactorías.
8. El análisis de ácidos grasos resulta en una herramienta útil para trazar la asimilación de desechos de la acuicultura como nuevo recurso trófico para la mayoría de los organismos asociados a piscifactorías.
9. La suma de ácido linoleico y ácido α -linolénico es un buen biomarcador del consumo de aceite de origen vegetal a través de los desechos de la acuicultura en peces teleósteos. Un nuevo índice más útil para especies de macroinvertebrados es la suma de ácido oleico y ácido linoleico, cuando estos reflejan la contribución de ácidos grasos vegetales del pienso.

Conclusión general:

Los perfiles de ácidos grasos reflejan el comportamiento alimentario de la fauna asociada a las granjas, sugiriendo que especies tanto de peces como de macroinvertebrados aprovechan los desechos acuícolas, contribuyendo a reducir su acumulación en la zona. Los peces salvajes deben adaptar su fisiología a las nuevas condiciones dietéticas cuando llegan y permanecen en los alrededores de las piscifactorías, sin que haya aparentes efectos negativos en las funciones del hígado, de la inmunología y la reproducción. La migración a áreas alejadas no garantiza una pronta recuperación de los perfiles naturales de ácidos grasos, y no se puede concluir la posibilidad de efectos negativos a largo plazo.