

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA
CURSO 2023-2024
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

OPTIMIZACIÓN DEL EXTRACTO DE TEJIDO
BLANDO DE *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* EN
BASE A SU CAPACIDAD ANTIBACTERIANA PARA
SUPLEMENTACIÓN EN DIETAS DE ACUICULTURA

Autor: Raquel Gil Mínguez

Tutor académico: Ricardo Mallavia Marín

Co-tutor 1: Juan Alberto Falcó Graciá

Co-tutor 2: Raúl Bonet García

Dr. Ricardo Mallavia, Catedrático de Universidad de la Universidad Miguel Hernández de Elche; Dr. Alberto Falcó, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas; y D. Raúl Bonet, doctorando de la Universidad Miguel Hernández.

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado:

“OPTIMIZACIÓN DEL EXTRACTO DE TEJIDO BLANDO DE *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* EN BASE A SU CAPACIDAD ANTIBACTERIANA PARA SUPLEMENTACIÓN EN DIETAS DE ACUICULTURA”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

Dña. Raquel Gil Mínguez

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 21 de junio de 2024

Fdo.: Prof.

RESUMEN

La acuicultura juega un papel crucial en las perspectivas de seguridad alimentaria global al ser una alternativa a la sobreexplotación de los recursos marinos. Sin embargo, la industria enfrenta una serie de desafíos en términos de sostenibilidad. Uno de los problemas más críticos es la incidencia de enfermedades bacterianas, agravadas actualmente por el cambio climático, ya que frecuentemente conllevan un uso excesivo de antibióticos con graves impactos ambientales. Además, la gestión de los descartes, que no cumplen con los estándares comerciales, representa otro problema crítico que necesita ser abordado en esta industria. Por consiguiente, este estudio pretende extraer compuestos bioactivos del mejillón Mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*), la especie de moluscos más cultivada en España, con los objetivos de (i) seleccionar condiciones de extracción aleatorias en base a variables predefinidas aplicando el procedimiento Box-Behnken (ii) determinar la actividad antimicrobiana y antioxidante, la cantidad de proteína y el rendimiento de estas extracciones y (iii) determinar las condiciones óptimas de extracción mediante Box-Behnken priorizando la actividad antibacteriana. Para lograr estos objetivos, primero se optimizaron parámetros de extracción como el ratio (g analito/ml disolvente), la potencia de ultrasonidos (J/ml) y el tiempo de maceración (h). Para ello, se utilizó un modelo estadístico de Box-Behnken mediante una evaluación exhaustiva de varios factores que influyen en el proceso de extracción, como el contenido proteico y su capacidad antibacteriana y antioxidante. Además, se llevaron a cabo trabajos adicionales para la caracterización molecular de los extractos obtenidos como la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo con ionización por electrospray (HPLC-ESI-QqQ-MS) y la medición de espectros de absorbancia UV-Vis. Sin embargo, la identificación precisa de los péptidos antimicrobianos posiblemente responsables de la actividad antibacteriana se vio dificultada tanto por las limitaciones técnicas asociadas a los métodos de extracción como a la complejidad de la matriz biológica del mejillón. Estos desafíos subrayan la necesidad de desarrollar estrategias avanzadas de fraccionamiento y purificación para profundizar en la comprensión de los mecanismos bioquímicos involucrados en la defensa contra patógenos de *M. galloprovincialis*. Por lo tanto, los resultados de esta investigación representan un estudio preliminar para futuras investigaciones con el fin de encontrar alternativas innovadoras a los antibióticos y mejorar la eficiencia y sostenibilidad de la industria acuícola.

Palabras clave: Extracción orgánica; *Mytilus galloprovincialis*; Box-Behnken; Capacidad antibacteriana; Actividad antioxidante; Acuicultura.

ABSTRACT

Aquaculture plays a crucial role in global food security by offering an alternative to the overfishing of marine resources. However, the industry faces several sustainability challenges. One of the most critical issues is the incidence of bacterial diseases, exacerbated by climate change, which often leads to excessive use of antibiotics with serious environmental impacts. Additionally, managing non-commercial discards is another critical issue that needs to be addressed in this industry. Therefore, this study aims to extract bioactive compounds from the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*), the most cultivated mollusk species in Spain, with the objectives of (i) selecting extraction conditions based on predefined variables using the Box-Behnken procedure, (ii) determining the antimicrobial and antioxidant activity, protein content, and yield of these extractions, and (iii) optimizing extraction conditions using Box-Behnken to prioritize antibacterial activity. To achieve these objectives, extraction parameters such as ratio (g analyte/ml solvent), ultrasonic power (J/ml), and maceration time (h) were first optimized. A Box-Behnken statistical model was used to comprehensively evaluate various factors influencing the extraction process, including protein content and its antibacterial and antioxidant capacity. Additional work was carried out for molecular characterization of the extracts using high-performance liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometer with electrospray ionization (HPLC-ESI-QqQ-MS) and UV-Vis absorbance spectroscopy. However, precise identification of antimicrobial peptides possibly responsible for antibacterial activity was hindered by technical limitations associated with extraction methods and the biological complexity of the mussel matrix. These challenges underscore the need to develop advanced fractionation and purification strategies to deepen the understanding of biochemical mechanisms involved in defense against pathogens in *M. galloprovincialis*. Therefore, the results of this research represent a preliminary study for future investigations aimed at finding innovative alternatives to antibiotics and improving the efficiency and sustainability of the aquaculture industry.

Key words: Organic extraction; *Mytilus galloprovincialis*; Box-Behnken; Antibacterial capacity; Antioxidant activity; Aquaculture.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	7
1.1.	ACUICULTURA Y SU CONTRIBUCIÓN GLOBAL	7
1.2.	IMPACTO MEDIOAMBIENTAL	8
1.3.	DESAFÍOS PARA SU VIABILIDAD.....	9
1.4.	PATÓGENOS BACTERIANOS	11
1.5.	SOLUCIONES ACTUALES	13
1.6.	ALTERNATIVAS INNOVADORAS.....	14
1.7.	ANTECEDENTES.....	16
2.	OBJETIVO	17
3.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	17
3.1.	COLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	17
3.2.	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN (BOX-BEHNKEN).....	18
3.3.	EXTRACTOS DE MEJILLÓN	19
3.4.	DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN.....	20
3.5.	CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	21
3.5.1.	ESPECTROS DE ABSORCIÓN UV-VIS	21
3.5.2.	ESPECTROMETRÍA DE MASAS (HPLC-MS)	21
3.6.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO.....	22
3.7.	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	22
3.8.	ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	23
4.	RESULTADOS.....	24
4.1.	AJUSTE DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DE EXTRACCIÓN.....	24
4.2.	DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN.....	25
4.3.	CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	26
4.4.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO.....	28
4.5.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	28
4.6.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	29
4.7.	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN	30
5.	DISCUSIÓN	35
6.	CONCLUSIONES.....	37
7.	BIBLIOGRAFÍA	39

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Acuicultura y su contribución global

La acuicultura actual, avanzada y sofisticada, tiene sus raíces en los primeros intentos realizados hace miles de años (Costa-Pierce, 2022), donde algunas poblaciones asiáticas cultivaban y criaban pescado para su consumo (Liao y Chao, 2009). Actualmente, se define como una práctica tradicional dedicada al cultivo controlado de especies en diferentes sistemas acuícolas, ya sean de agua dulce, salobre o salada, con el objetivo de producir alimentos de manera sostenible para el consumo humano (Lucas, J. 2015). Esta práctica implica la cría y cultivo de diversas especies incluyendo peces de agua dulce y salada, así como moluscos, crustáceos, algas y otros organismos acuáticos, sumando un total de 652 especies cultivadas a escala mundial (FAO, 2022). Las especies dominantes son cruciales para el futuro de la acuicultura, aunque es igualmente esencial destacar la importancia de las especies minoritarias, ya que desempeñan un papel fundamental en la diversidad de esta práctica (Sicuro, 2021).

A nivel global, la expansión de la acuicultura se ha logrado mediante la implementación de instalaciones tanto en áreas terrestres (Lima Junior *et al.*, 2018; Chance *et al.*, 2018) como en entornos marinos (Gentry *et al.*, 2017), por lo que los productos de la acuicultura se han convertido en objetos de producción y comercialización tanto a pequeña como a gran escala (Subasinghe *et al.*, 2009). El mayor crecimiento se observa en la producción liderada por Asia, que aporta el 91,6 % del suministro total de productos acuáticos, incluyendo tanto animales como algas (FAO, 2022), y se destaca China como el principal país en producción y exportación a nivel global (Chen y Gao, 2023). Asimismo, en el transcurso de los años, dicha actividad ha propiciado la generación de millones de empleos, en gran medida ubicados en zonas marginales, además de atraer inversiones de gran relevancia tanto a nivel nacional como en el ámbito internacional, contribuyendo así al fortalecimiento económico en ambas escalas (Liao y Chao, 2009).

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), desde 1990 hasta el año 2020, la acuicultura mundial experimentó un crecimiento del 609 %. En 1990, la producción anual era de 17,3 millones de toneladas, mientras que en 2020 alcanzó la cifra de 122,6 millones de toneladas (FAO, 2022). Este crecimiento de producción se distribuye entre la producción marina, que ascendió a 68,1 millones de toneladas de peso vivo en 2020, superando a la producción continental, que alcanzó los 54,4 millones de toneladas de peso vivo en este mismo año.

La acuicultura y la pesca son dos actividades con una labor de gran importancia en la economía global y la seguridad alimentaria y nutricional (Norman *et al.*, 2019), siendo la pesca de captura responsable del 51 % de la producción acuícola global, mientras que la acuicultura representó el 49 %, en el año 2020 (FAO, 2022). A pesar de la gran contribución que representa la pesca, la sobreexplotación pesquera ha emergido como un problema mundial, agravado por cubrir el abastecimiento alimentario de la sobrepoblación y la gran demanda de consumo. Esta práctica pone a prueba la biodiversidad y los servicios ecosistémicos marinos (Srinivasan *et al.*, 2010; Ferguson-Cradler, 2021; Yan *et al.*, 2021), dando lugar a una progresiva degradación de los ecosistemas y provocando la pérdida parcial o total de los mismos (Pope *et al.*, 2016). Como consecuencia, se enfrenta a la insuficiencia de poblaciones de peces y a la competitividad de precios originados por la limitada biodisponibilidad (Li *et al.*, 2016). Por tanto, la acuicultura se considera una práctica que contribuye significativamente a la

reducción de la presión sobre los caladeros salvajes y a la estabilidad de los ecosistemas marinos, amenazados hasta hace poco por la sobreexplotación de la pesca extractiva. Es esencial aprovechar esta abundante fuente de alimentos provenientes de la acuicultura para satisfacer la demanda de pescado en la alimentación humana (Llorente García, 2013).

Esta enorme evolución de la acuicultura no solo implica una participación más amplia en el suministro y la demanda de proteína animal a largo plazo (Naylor *et al.*, 2021), sino que también ha despertado un gran interés en la población por un mayor consumo de estos productos de alto valor nutricional. Este interés se debe en parte a los avances tecnológicos y mejoras en los sistemas de cultivo, los cuales han mejorado no solo la accesibilidad a estos alimentos a la población, sino también su precio y, más importante su calidad, al estar sometidos a los controles sanitarios aplicados a los sistemas de producción animal y de la industria alimentaria. Además, se consideran productos sostenibles para el medio ambiente y contribuyen a mejorar la calidad nutricional de la dieta al ser una rica fuente de proteínas y ácidos grasos esenciales (Norman *et al.*, 2019). Cabe destacar que no todos los alimentos y productos provenientes de la acuicultura tienen como objetivo el consumo humano. Muchos se emplean con diferentes propósitos, tales como la producción de harinas y aceites de pescado en alimentos acuícolas industriales, la fabricación de cebos, en industria farmacéutica o como alimento para otros animales (FAO, 2022).

1.2. Impacto medioambiental

La acuicultura marina puede ser una alternativa favorable a la pesca extractiva, siempre y cuando se realice una gestión adecuada que permita alcanzar los objetivos socioeconómicos sin afectar el medio natural en la medida de lo posible. (Norman *et al.*, 2019). Sin embargo, a lo largo de un extenso periodo, ha surgido una serie de problemáticas que plantean cuestionarse la sostenibilidad de dicha práctica. Estos desafíos abarcan varios aspectos que afectan a su viabilidad a largo plazo, generando incertidumbre sobre su impacto ambiental y su capacidad para mantener un equilibrio sostenible en el tiempo (Martínez-Porchas and Martínez-Cordova, 2012). Desde una perspectiva medioambiental, las interacciones que surgen entre la acuicultura marina y el océano son muy complejas. Esta práctica introduce una serie de modificaciones en el entorno (Clavelle *et al.*, 2019), como la transformación y destrucción de paisajes (Walters *et al.*, 2008) o la acumulación de los desechos orgánicos que eutrofizan el entorno (Chislock *et al.*, 2013), los cuales modifican las comunidades de organismos de la columna de agua y del sedimento bentónico (Holmer *et al.*, 2003; Alonso-Rodríguez and Páez-Osuna 2003; Hargrave, 2010), influyendo directamente en la biodiversidad de las especies salvajes (Wang *et al.*, 2010).

Sin embargo, el mayor desafío global de esta industria es el impacto medioambiental provocado por el abuso de antibióticos para tratar enfermedades infecciosas en los cultivos (Lafferty *et al.*, 2015). La constante interacción entre los organismos cultivados y los silvestres da lugar a un aumento y propagación de brotes infecciosos en ambas poblaciones, resultando en una gran mortalidad de individuos y en grandes pérdidas económicas para las industrias acuícolas (Krkošek, 2017). Por esta razón, este uso excesivo está dirigido para prevenir y tratar enfermedades con el fin de salvaguardar la producción (Van Boeckel *et al.*, 2015), dado que la industria necesita producir grandes cantidades de alimentos acuícolas para satisfacer las necesidades de la población y lograr los objetivos económicos (Vignesh *et al.*, 2011; Schar *et al.*, 2020).

Además, el cultivo intensivo, altamente extendido en la acuicultura, se caracteriza por mantener organismos en altas densidades en espacios limitados, favoreciendo las condiciones óptimas para una mayor incidencia de enfermedades (Santos y Ramos, 2018). Este método induce estrés en los organismos cultivados, afectando su bienestar y aumentando su vulnerabilidad a las enfermedades debido a las condiciones desfavorables en las que se enfrentan (Oliva-Teles, 2012).

Estas circunstancias de cultivo hacen que la administración adecuada de antibióticos se convierta en una tarea complicada que requiere una minuciosa y determinada gestión. La metafilaxis, un método muy empleado, implica la dispensación de fármacos en cultivos con individuos tanto sanos como enfermos, aumentando la dosificación de los fármacos para alcanzar a los individuos enfermos dentro de la población (Cabello *et al.*, 2013). La principal vía de administración suele ser a través de la incorporación en las dietas, aunque también se utiliza la disolución en el agua o la administración por inyecciones (Cabello, 2006). Sin embargo, los resultados farmacocinéticos suelen ser insatisfactorios (Leal *et al.*, 2019), ya que la biodisponibilidad del fármaco varía según la especie, tamaño, edad, sexo, parámetros del agua y vía de administración (Sidhu *et al.*, 2018). La biodisponibilidad del antibiótico en el organismo, transcurridas algunas horas, tiende a ser significativamente reducida lo que conlleva a su diseminación en el entorno ambiental mediante las deposiciones fecales o por la presencia en el alimento no ingerido (Elema *et al.*, 1996; Rigos *et al.*, 2004; González-Gaya *et al.*, 2022; Corum *et al.*, 2023). Como resultado, los impactos ambientales son significativos, pues el ecosistema marino caracterizado por su hidrodinamismo constituye un medio favorable para la dispersión, transmisión y acumulación de estos fármacos (Fortt Z *et al.*, 2007; Quimpo *et al.*, 2020).

Para asegurar prácticas seguras y sostenibles, hay que abordar de manera preventiva los desafíos asociados con los antibióticos, los cuales tienen un impacto considerable en la salud pública debido a la resistencia que generan. (Helsens *et al.*, 2020). En la actualidad, la resistencia a los antibióticos constituye una grave problemática para esta industria (Seyfried *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2018; Suyamud *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2021; Lassen *et al.*, 2022), ya que las dosis tan altas y abusivas de antibióticos utilizadas propician una mayor proliferación de bacterias resistentes y genes de resistencia (Salgueiro *et al.*, 2024). Además, el entorno natural se presenta como un extenso almacén genético y numerosas investigaciones documentan la aparición y aumento de estos genes resistentes a antibióticos en el medio marino (Tamminen *et al.*, 2011; Tomova *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2020; Shen *et al.*, 2020; C. Li *et al.*, 2023). Este tema requiere una atención detallada debido también a las posibles implicaciones en la salud pública asociadas (Reverter *et al.*, 2020). La producción acuícola destaca la necesidad de investigaciones adicionales y medidas regulatorias adecuadas con el objetivo de controlar el aumento de la resistencia a antibióticos (Salas *et al.*, 2021).

1.3. Desafíos para su viabilidad

En el contexto de una creciente demanda global de productos marinos, es crucial identificar y resaltar las amenazas que comprometen la viabilidad de la acuicultura como una industria alimentaria sostenible y constante en el tiempo. Es de vital importancia la conservación de los ecosistemas marinos para provisionar a la sociedad humana los bienes y servicios necesarios (Sumaila, 2022). No obstante, la creciente presión antropogénica ha generado importantes repercusiones en el medio marino, resultando en graves efectos a largo plazo (Halpern *et*

al., 2008; Halpern *et al.*, 2015). Estos efectos incluyen el fenómeno del cambio global, que conlleva una serie de modificaciones biofísicoquímicas y socioeconómicas, con consecuencias que perturban la funcionalidad natural del medio (Álvarez-Lires *et al.*, 2017).

El funcionamiento de estos ecosistemas se ve significativamente afectado por las consecuencias del cambio climático, una parte integral del cambio global, que altera la dinámica de las masas de agua, eleva el nivel del mar, provoca cambios en el pH debido al aumento en la concentración de dióxido de carbono disuelto, induce la eutrofización de las aguas y modifica la temperatura, entre otros aspectos (He y Silliman, 2019). En concreto, la variación de la temperatura conlleva un calentamiento de los océanos y conduce a la aparición más frecuente de olas de calor marinas, caracterizadas por aumentos de temperatura en las capas superficiales del agua. Este fenómeno ha aumentado significativamente en intensidad y frecuencia, provocando eventos asociados a mortalidad masiva en diversas especies marinas (Hobday *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2021), y cambios en la diversidad microbiana (Lara Flores, 2010).

La acuicultura marina depende de la temperatura medioambiental y por tanto se ve afectada por el cambio climático debido a las perturbaciones que experimentan los propios entornos acuáticos, lo que a su vez tiene un impacto en las poblaciones cultivadas (Klinger *et al.*, 2017). En los sistemas de producción acuícola, la calidad del agua desempeña un papel fundamental en la prevención de enfermedades y la reducción de la mortalidad (Yang *et al.*, 2021), pero se ve afectada por diversas alteraciones en los parámetros físicoquímicos como la temperatura, la salinidad, el oxígeno disuelto y la turbidez. Por lo tanto, es fundamental tener en cuenta estos cambios para asegurar un óptimo desarrollo de los organismos cultivados (S.N. Chen, 1991).

Los cambios de temperatura, tales como las olas de calor o periodos de frío extremo se han identificado como uno de los principales desafíos en la acuicultura, ya que afecta significativamente la vulnerabilidad de los organismos y generan alteraciones en su metabolismo, fisiología, comportamiento alimenticio, sistema inmune o nivel de estrés, entre otros (Zhang *et al.*, 2020; Alfonso *et al.*, 2021; Mugwanya *et al.*, 2022a).

Dado que los peces son ectotermos, su temperatura corporal se ajusta según las condiciones térmicas del ambiente circundante (Haesemeyer, 2020). Las variaciones abruptas en la temperatura del agua que exceden los límites fisiológicos desencadenan un estado de estrés en los peces, lo que provoca una disminución en la eficiencia de su sistema inmunológico (Scharsack and Franke, 2022). A pesar de que cada especie está adaptada a diferentes rangos fisiológicos de temperatura, los cambios en esta variable, particularmente los aumentos, modifican su sistema inmunológico, resultando en una disminución o supresión de sus mecanismos de defensa (Abram *et al.*, 2017) y en una mayor susceptibilidad a diversas enfermedades (Scharsack and Franke, 2022).

Las altas temperaturas del agua constituyen una preocupación importante y actual, ya que influyen directamente en la expresión de la virulencia de los patógenos, favoreciendo su persistencia y proliferación en el medio (Barbosa Solomieu *et al.*, 2015). El desarrollo de enfermedades está condicionado por múltiples variables, entre ellas el estado de salud del huésped, la naturaleza del agente infeccioso y las condiciones ambientales. En situaciones donde la temperatura experimenta un cambio y el huésped presenta una vulnerabilidad incrementada, los agentes patógenos, especialmente las bacterias, tienen la capacidad de modificar su material genético y adaptarse a las nuevas condiciones ambientales para llevar a cabo la infección (Guijarro *et al.*, 2015). Además, el aumento de las temperaturas en el medio marino está propiciando la colonización y establecimiento

de patógenos alóctonos hacia nuevos entornos, lo que conlleva un aumento del desequilibrio ecológico y una mayor incidencia de enfermedades, en áreas donde anteriormente no existían estos problemas (Casu *et al.*, 2024). Por lo tanto, los cambios provocados por el efecto del cambio climático dan lugar a significativas pérdidas económicas para la industria y una gran amenaza en la seguridad alimentaria (Reverter *et al.*, 2020).

El cambio global antropogénico presenta otras implicaciones adicionales como la acumulación significativa de microplásticos en todos los ecosistemas oceánicos del mundo (van Sebille *et al.*, 2015). Los microplásticos (<5 mm) generan consecuencias ecológicas significativas en los sistemas de acuicultura, dando lugar a riesgos toxicológicos tanto para las especies cultivadas como para la salud humana. Su transporte a través de las corrientes oceánicas provoca una progresiva fragmentación de su tamaño, al mismo tiempo que adsorben otros contaminantes como metales pesados o son colonizados por bacterias patógenas, intensificando aún más su impacto (Dong *et al.*, 2021). Estas micropartículas proporcionan un sustrato ideal, debido a su prolongada duración y movilidad, para la propagación de microorganismos en el entorno, albergando numerosos taxones patógenos de animales marinos y humanos (Kirstein *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2019), y además promoviendo el aumento en el intercambio de genes de resistencia entre bacterias, contribuyendo así a una mayor resistencia a los antibióticos (Frère *et al.*, 2018; Stenger *et al.*, 2021).

Por último, la globalización es un factor añadido que amenaza la gestión sanitaria, ya que aumenta y facilita la difusión de organismos resistentes a los antimicrobianos y enfermedades infecciosas inmunes a los antibióticos. La movilidad de la población hacia zonas con diferentes servicios sanitarios y patógenos contribuye al aumento de nuevas resistencias y enfermedades (MacPherson, 2009).

1.4. Patógenos bacterianos

La comprensión de los patógenos que afectan a los cultivos, así como la evaluación de las consecuencias y los factores que los favorecen, es esencial para gestionar y controlar eficazmente su prevención, lo cual se convierte en una herramienta valiosa para promover una práctica sostenible, saludable y económicamente viable a largo plazo (Ma *et al.*, 2023). En este sector alimentario, se encuentran diversos agentes patógenos responsables de enfermedades, entre los cuales se destacan hongos, bacterias, virus y ectoparásitos (de Bruijn *et al.*, 2018). Muchos de estos patógenos, tienen la capacidad de operar como agentes zoonóticos, demostrando su habilidad para afectar a los peces y, consecuentemente, transmitirse a los seres humanos (Ziarati *et al.*, 2022). Es crucial enfatizar que la virulencia de cada microorganismo en relación con los peces está intrínsecamente vinculada a una interacción compleja de factores tanto bióticos como abióticos. Dichos factores, a su vez, actúan de manera sinérgica para favorecer la instauración y propagación de las infecciones en los hospedadores (Ben Hamed *et al.*, 2018).

Las bacterias emergen como microorganismos de alta relevancia en el contexto de la acuicultura, particularmente en lo que concierne a la salud de los peces. Se destaca la presencia significativa de infecciones por diversas especies bacterianas, las cuales son muy frecuentes y están estrechamente asociadas a costos considerables (Ben Hamed *et al.*, 2018). Entre los agentes bacterianos de mayor relevancia, se encuentran *Vibrio*, *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* o *Flavobacterium*, entre otras (Miller and Harbottle, 2018). Además, *Escherichia coli* es una bacteria que reside de forma habitual en el tracto intestinal de los peces

y posee la capacidad de inducir deterioro en el tejido del pez en caso de migración hacia otros órganos, dando lugar a un futuro producto en estado desfavorable para el consumo, comprometiendo los beneficios económicos y la salud humana (Adanech and Temesgen, 2018).

Dentro de este contexto, merece especial atención la destacada presencia de microorganismos marinos pertenecientes al género *Vibrio* (Regev *et al.*, 2020). Es necesario destacar la relevancia de estas infecciones bacterianas, enfocándonos en la familia *Vibrionaceae* que emerge como protagonista en el panorama epidemiológico de la acuicultura (García-Rosado *et al.*, 2007; Abdel-Aziz *et al.*, 2013; Kashulin *et al.*, 2017; Deng *et al.*, 2020). La vibriosis emerge como una de las principales enfermedades que afectan a los peces marinos en todo el mundo, ejerciendo su influencia en diversas especies piscícolas, ya sean silvestres o en ambientes de cultivo (Mohamad *et al.*, 2019). Cabe destacar que esta patología guarda una estrecha relación con la temperatura, dado que las elevadas temperaturas exhiben una correlación directa con una mayor prevalencia de microorganismos pertenecientes a dichas bacterias, lo que, a su vez, se traduce en una mayor tasa de mortalidad en poblaciones de peces (Albert and Ransangan, 2013). Además, la especie *Vibrio cholerae* es la causante de la enfermedad del cólera debido a que es un patógeno humano transmitido a través de la ingesta de alimentos de origen marino (Arévalo *et al.*, 2003).

Los patógenos del género *Aeromonas* representan una seria amenaza, siendo *Aeromonas salmonicida*, la especie más común de este género. A pesar de que la nomenclatura de *Aeromonas salmonicida* insinúa preferencia por los salmónidos, es relevante señalar que esta bacteria ejerce su impacto tanto en salmónidos como en no salmónidos, afectando a diversas especies, incluyendo la carpa y la platija europea. En salmónidos, afecta en diferentes etapas de desarrollo, desde juveniles hasta adultos, causando infecciones graves y extendidas en la sangre, lo que puede llevar a consecuencias mortales para los organismos afectados (Cipriano and Bullock, 2001). En los no salmónidos, se producen lesiones externas en la dermis que incluyen la inducción de hemorragias, úlceras y necrosis en los individuos hospedadores, lo que se traduce en posibles cambios en el comportamiento de natación y la pérdida de apetito en los peces afectados (Wiklund and Dalsgaard, 1998).

El género *Streptococcus* engloba diversas especies bacterianas responsables de la enfermedad conocida como estreptococosis. El primer registro de *Streptococcus iniae* fue documentado en cultivos de peces en Japón, y desde entonces, esta bacteria ha propagado brotes de mortalidad en diversas especies cultivadas de aguas cálidas a nivel global, incluyendo la tilapia o la trucha arco iris (Agnew y Barnes, 2007). Además de su impacto en la salud acuática, *Streptococcus iniae* presenta la capacidad de transmitirse a los humanos, ocasionando infecciones cutáneas asociadas a la manipulación de pescado fresco destinado al consumo (Facklam *et al.*, 2005).

Pseudomonas constituye un conjunto de bacterias oportunistas que exhibe una notable falta de preferencia por un huésped específico. Su impacto se extiende a individuos tanto silvestres como cultivados, principalmente en entornos acuáticos marinos y salobres. En este contexto, la especie *Pseudomonas plecoglossicida* ha emergido como una seria preocupación en el ámbito de las enfermedades en la acuicultura, manifestando la capacidad de infectar generando lesiones caracterizadas por manchas blancas en órganos vitales como el bazo, riñón e hígado, y ocasionando una elevada tasa de letalidad en teleósteos (Zeng *et al.*, 2022). La aptitud para la infección se manifiesta en aguas con temperaturas más elevadas, mientras que esta especie se presenta como inocua en rangos de temperatura inferiores (Chengwei Li *et al.*, 2020)

El género *Mycobacterium* spp. afecta a los peces generando consecuencias adversas en diversos aspectos, como la movilidad, el peso y el funcionamiento de sus órganos, llegando incluso a provocar la mortalidad. En el caso de las infecciones en seres humanos, este patógeno actúa como patógeno oportunista, dando lugar a daños en la integridad cutánea (Hashish *et al.*, 2018).

Las bacterias pertenecientes al género *Flavobacterium* se encuentra estrechamente vinculado a enfermedades que afectan a los salmónidos, con una especial predilección por la trucha arco iris y el salmón del Pacífico, pero también a otras especies que no son salmónidos (Donati *et al.*, 2021). La especie *Flavobacterium psychrophilum* se identifica como el agente bacteriano de mayor relevancia. Entre las enfermedades más prevalentes que esta especie origina, se incluyen la enfermedad de agua fría, destacándose las temperaturas inferiores a 10 °C como un factor crítico para la susceptibilidad a la infección por estas bacterias, y el síndrome de alevines de la trucha arcoiris, caracterizado por la inducción de anemia y la afectación multisistémica, se presenta como otra manifestación patológica relevante con un elevado porcentaje de mortalidad en la población afectada (Nematollahi *et al.*, 2003).

Edwardsiella abarca múltiples especies distribuidas en ambientes de agua dulce y salada a nivel global. Entre ellas, tres especies, *E. piscicida*, *E. ictaluri* y *E. anguillarum*, se destacan como patógenos de peces. Estas especies exhiben una notable capacidad patógena y presentan una notable plasticidad genética, permitiéndoles adaptarse a diversos entornos y modular sus genes para potenciar su virulencia (Leung *et al.*, 2022). Cabe destacar que estas bacterias también manifiestan patogenicidad en humanos, principalmente causando casos de gastroenteritis. En consecuencia, este género bacteriano demuestra una resistencia significativa a los cambios ambientales, conformando un grupo patógeno de relevancia tanto para la salud de los peces como para la salud humana, lo cual puede tener implicaciones perjudiciales para las empresas dedicadas a la acuicultura (Leung *et al.*, 2019).

1.5. Soluciones actuales

Es necesario la implementación de diversos métodos para mitigar los efectos de los patógenos, dado que las pérdidas económicas derivadas de las enfermedades son considerablemente significativas (Defoirdt *et al.*, 2011). La medida más común en la acuicultura para abordar enfermedades bacterianas es el uso de antibióticos, pero hay que tener en cuenta la considerable y principal problemática que representan las infecciones bacterianas en los cultivos y en la salud humana (Schar *et al.*, 2020). También se utilizan otras estrategias de prevención, entre las cuales se incluyen determinados tratamientos químicos (como pesticidas, anestésicos, antiincrustantes y desinfectantes) (Burrige *et al.*, 2010), vacunas (Adams, 2019), controles biológicos, mecánicos o genéticos (Buchmann, 2022) y uso de prebióticos o probióticos (Akhter *et al.*, 2015).

En el tratamiento con vacunas antibacterianas, se destacan dos tipos principales: las biovacunas vivas atenuadas, que activan el sistema inmune de los peces con una dosis baja para protegerlos contra enfermedades, y las vacunas orales bioencapsuladas, diseñadas para resistir el ambiente ácido del estómago y proporcionar una liberación controlada de antígenos en el tracto digestivo, reduciendo así el estrés y la manipulación de los peces. Sin embargo, este tipo de tratamientos se encuentra en fase inicial y requiere una serie de avances adicionales para su implementación en la industria acuícola comercial (Soliman *et al.*, 2019).

El uso de la genética se utiliza con el objetivo de mejorar la resistencia a patógenos y promover una tasa de crecimiento más rápida. Esta técnica utiliza la modificación genética para potenciar la salud de los peces y crear generaciones sucesivas en condiciones genéticamente adaptadas, con miras a obtener beneficios económicos sostenidos a lo largo de ellas (Gjedrem, 2012). No obstante, la implementación de esta estrategia demanda una rigurosa investigación y el seguimiento de aspectos éticos para asegurar una introducción responsable de estos alimentos transgénicos en el mercado (Mugwanya *et al.*, 2022a).

Por último, los probióticos y prebióticos emergen como agentes esenciales, desempeñando un papel crucial como suplementos alimenticios destinados a potenciar la salud general de los peces de cultivo. Su impacto se manifiesta de manera significativa, mejorando no solo el crecimiento, digestión, tamaño y peso de los organismos acuáticos, sino también como componentes alimenticios adicionales que inciden positivamente en el fortalecimiento del sistema inmunológico. Esta estrategia nutricional persigue la optimización de las condiciones de cultivo, y aspira a fomentar un uso de productos naturales alternativos que sean inmunoestimulantes para conseguir una mejora en la gestión de las enfermedades (Akhter *et al.*, 2015). Aunque estos suplementos muestran potenciales beneficios en la dieta, es necesario realizar investigaciones adicionales para profundizar su mecanismo de acción en el organismo, así como comprender la interacción entre las cepas utilizadas y los componentes digestivos y alimentarios (Mugwanya *et al.*, 2022b).

Por lo tanto, el control de enfermedades en la industria acuícola demanda una continua investigación de métodos para enfrentar este desafío. En este contexto, es esencial adoptar nuevas estrategias ecológicas y favorables tanto para la producción como para el medio ambiente y el consumidor, las cuales aborden eficazmente las enfermedades en la industria acuícola y al mismo tiempo promuevan la sostenibilidad del sector a largo plazo.

1.6. Alternativas innovadoras

La búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos, específicamente antibacterianos, en invertebrados marinos, emerge como una alternativa innovadora frente a las soluciones vigentes para abordar diversas enfermedades infecciosas en la acuicultura (Oh *et al.*, 2018).

Los invertebrados marinos cuentan con una amplia gama de biomoléculas en su sistema inmunológico innato, dedicadas a la defensa contra microorganismos patógenos (Tincu and Taylor, 2004). Dado la falta de un sistema inmunológico adquirido bien desarrollado, su sistema inmunitario innato constituido por componentes humorales y celulares incluye proteínas con capacidad antimicrobiana (Sanmartín, 2015), moléculas esenciales para la salud y supervivencia de los organismos que les permite hacer frente a una variedad de desafíos ambientales (Allam y Raftos, 2015). Esta enorme fuente natural plantea la posibilidad de buscar proteínas con propiedades antibióticas como alternativa a los fármacos convencionales, representando una potencial alternativa para el tratamiento de enfermedades en la acuicultura (Oh *et al.*, 2018).

Los moluscos bivalvos son organismos filtradores y se sustentan de las comunidades de organismos presentes en el medio, lo que los hace albergar una mayor presencia de patógenos, incluidos virus, bacterias y endoparásitos (Venier *et al.*, 2011). Además, se ven expuestos a notables cambios en las condiciones ambientales debido a las zonas intermareales en las que habitan, donde los parámetros físicos, químicos y biológicos fluctúan

de manera significativa y frecuente. El conjunto de estas características ha provocado adaptaciones evolutivas en moluscos bivalvos, especialmente en su sistema inmune innato, permitiéndoles mejorar su supervivencia en el medio (Tincu and Taylor, 2004; Rosani *et al.*, 2011).

En particular, los mejillones presentan un mecanismo de filtración muy eficiente para la ingesta de alimentos, el cual les ha provocado una notoria resistencia a las enfermedades. Esta forma de alimentación acumula agentes patógenos en sus tejidos, reduciendo la carga microbiana del agua. Por lo tanto, los mejillones actúan como un sistema de filtración biológico natural, disminuyendo la probabilidad de transmisión de enfermedades a otros organismos (Klohmann y Padilla-Gamiño, 2022).

El mejillón Mediterráneo *Mytilus galloprovincialis* aparece como un prometedor organismo modelo para estudiar las moléculas bioactivas antimicrobianas (Sanmartín, 2015), ya que se trata de una especie que se distingue por su marcada capacidad de adaptación a variaciones ambientales, lo que se traduce en una notable resistencia frente a dichos cambios y una baja incidencia de episodios de mortalidad (Calvar, 2013). Se han llevado a cabo numerosos estudios que evidencian la presencia de diversas clases de péptidos antimicrobianos (AMP) en esta especie de mejillón (Mitta, 2000; Pallavicini *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009; Balseiro *et al.*, 2011; Pacor *et al.*, 2021). Estos AMP constituyen una variada gama de proteínas, como defensinas, mitilinas, miticinas y mitimicinas, cuya función primordial es mitigar la acción de agentes causantes de enfermedades infecciosas, tales como bacterias y virus (Venier *et al.*, 2011).

Una investigación más profunda sobre los componentes bioactivos antimicrobianos que se encuentran en la especie *M. galloprovincialis*, surge como una valiosa oportunidad para desarrollar una alternativa innovadora a los antibióticos ya establecidos. Gracias a la naturaleza de su hábitat y el proceso de cultivo asociado, esta especie ofrece un estudio altamente accesible, que facilita la obtención sistemática de ejemplares y garantiza un suministro constante de material biológico para la extracción y exploración de potenciales compuestos bioactivos antimicrobianos.

El mejillón cultivado en Galicia, la especie *M. galloprovincialis*, emerge como un molusco de gran relevancia en términos de cultivo, destacándose por su significativa contribución a la producción económica anual (Buceta, 2016). A pesar de que el marisqueo en la región de Galicia ha experimentado un notable desarrollo, consolidándose como uno de los principales sectores alimentarios que brindan empleo a miles de personas, es crucial considerar los impactos asociados.

Uno de los desafíos más preocupantes para las industrias acuícolas es la gestión de los desechos generados, un aspecto crítico en el contexto de la creciente demanda mundial de estos productos. En la actualidad, las productoras acuícolas se encuentran confrontadas con la tarea de administrar volúmenes considerables de desechos generados en sus sistemas de cultivo (Coppola *et al.*, 2021). Es importante considerar los descartes generados por la acuicultura de moluscos, que abarcan ejemplares que no cumplen con los estándares para la venta debido a su estado poco óptimo o tamaño insuficiente (Nag *et al.*, 2022). Por tanto, surge la necesidad de proponer alternativas para la gestión de estos desechos acuícolas, explorando la viabilidad de reutilizar dichos organismos en diferentes contextos, fomentando una mayor eficiencia y sostenibilidad de la industria acuícola. Por esta razón, para contrarrestar el impacto de los descartes, resulta esencial la implementación de medidas relacionadas con los principios de la bioeconomía circular. En el contexto estratégico establecido por la FAO

2002, surge la Agenda 2030, la cual propone la transformación azul con el objetivo de alcanzar el desarrollo sostenible en las prácticas acuícolas, abordando de manera integral la gestión de estos sectores tanto a nivel nacional como internacional. Este enfoque engloba la reutilización y el reciclaje de los desechos acuícolas, buscando reducir de manera significativa la cantidad de residuos generados, promoviendo prácticas más sostenibles y obteniendo mayores beneficios económicos (Coppola *et al.*, 2021).

Por lo tanto, se plantea una alternativa valiosa a estos desechos al considerar la posibilidad de reutilizar el tejido de mejillón como potencial suplemento en las dietas empleadas en la acuicultura. La utilización de tejido de mejillón podría mitigar la pérdida de recursos y ofrecer beneficios alternativos nutricionalmente significativos y protección inmunológica. La composición rica en proteínas, aminoácidos esenciales y otros nutrientes presentes en el tejido de mejillón podría contribuir de manera positiva al desarrollo saludable de otras especies acuáticas cultivadas, como los peces, debido a la mejora en la calidad de las dietas empleadas en la acuicultura.

Una de las perspectivas futuras consiste en desarrollar dietas saludables para peces que mejoren la calidad nutricional de las ya existentes y sean sostenibles para el medio ambiente, teniendo en cuenta los tratamientos de regulación para utilizar los desechos como alimento para otros animales (Mo *et al.*, 2018; Ahmad *et al.*, 2022). La ejecución de ensayos experimentales destinados a la formulación de nuevas composiciones alimenticias representa una estrategia esencial para potenciar diversos aspectos en la acuicultura. Estos ensayos tienen el potencial de mejorar la calidad intrínseca de las dietas empleadas y permiten optimizar la digestibilidad de los alimentos proporcionados a los peces. Además, la introducción de nuevas formulaciones alimenticias puede influir positivamente en el crecimiento de los peces, promoviendo un desarrollo más robusto y saludable. Un aspecto destacado de estas técnicas es su capacidad para conferir a las dietas un efecto protector frente a agentes patógenos, mejorando la resistencia y respuesta inmune de los peces alimentados (Oliva-Teles, 2012; Roques *et al.*, 2020).

Esta técnica propicia un desarrollo sostenible y desencadena un impulso innovador en la creación de nuevos productos, estableciendo así un ciclo que optimiza los recursos (J. Zhang *et al.*, 2023). La comprensión más profunda de la diversidad y función de los compuestos antimicrobianos en esta especie de mejillón no solo contribuye al conocimiento básico de la inmunología de estos moluscos, sino que también ofrece perspectivas valiosas para el desarrollo de prácticas relacionadas con la economía circular, fortaleciendo así la sostenibilidad y la salud general de las poblaciones de mejillones en la región de Galicia.

1.7. Antecedentes

Debido al considerable interés que la comunidad científica ha mostrado en los compuestos bioactivos de origen marino, en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), en la Universidad Miguel Hernández (UMH), se ha llevado a cabo diversas investigaciones sobre este tema, destacando el estudio de Ruiz-Torres *et al.* (2019) relacionado con compuestos bioactivos provenientes de extractos de invertebrados marinos. En ese estudio se produjeron y examinaron extractos de invertebrados marinos como nudibranchios, holoturias y corales, empleando la combinación de diclorometano y metanol (1:1, v/v) para la obtención de compuestos bioactivos. Se caracterizaron más de 98 compuestos de origen marinos, como péptidos, terpenos y alcaloides, entre otros. Estos compuestos exhibieron notable capacidad para inducir

efectos citotóxicos, muerte celular y apoptosis temprana en líneas celulares de carcinoma colorrectal humano. Además, se observó que todos estos extractos generaron acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), despolarización mitocondrial, activación de caspasas y daño al ADN. Estos hallazgos subrayan la importancia de explorar y optimizar métodos de extracción de compuestos bioactivos a partir de organismos marinos. La elección de la mezcla de disolventes en este estudio permitió la obtención de una cantidad significativa de compuestos bioactivos, lo que resalta la relevancia de elegir los disolventes y técnicas adecuadas para maximizar la extracción de estos compuestos.

En este contexto, este estudio propone optimizar el proceso de extracción de componentes orgánicos del mejillón *M. galloprovincialis* con capacidad antibacteriana. Entre los posibles componentes, estos péptidos no solo han demostrado potentes propiedades bioactivas en estudios preliminares, sino que también son de interés creciente debido a su potencial aplicación en la acuicultura. La optimización de este proceso de extracción permitirá no solo maximizar el rendimiento de estos péptidos, sino también caracterizar sus perfiles bioquímicos y evaluar su efectividad contra patógenos relevantes para la salud y el manejo sostenible de poblaciones acuícolas. Este enfoque no solo contribuirá al avance del conocimiento sobre los compuestos bioactivos marinos, sino que también abrirá nuevas oportunidades para el desarrollo de estrategias innovadoras en la salud animal y humana y la biotecnología aplicada a la acuicultura.

2. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es **optimizar las condiciones del proceso de extracción orgánica de individuos completos de mejillón Mediterráneo *Mytilus galloprovincialis* priorizando su actividad antibacteriana mediante el procedimiento estadístico Box-Behnken**. Para ello se ha planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar condiciones de extracción aleatorias en base a variables predefinidas aplicando el procedimiento Box-Behnken.
2. Determinar la actividad antimicrobiana y antioxidante, la cantidad de proteína y el rendimiento de estas extracciones.
3. Determinar las condiciones óptimas de extracción mediante Box-Behnken priorizando la actividad antibacteriana.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. Colección de muestras

Los mejillones vivos de la especie *M. galloprovincialis* fueron obtenidos en un supermercado local. Tras la llegada al laboratorio, los mejillones fueron abiertos y se desecharon la concha y el pie de todos para extraer exclusivamente el tejido blando del mejillón con el que se trabajaría. Posteriormente, fueron clasificados en base a su tamaño y sexo. Se comenzó realizando mediciones de todos los individuos para dividirlos en tres tamaños (pequeños, medianos o grandes), tomando medidas del tejido blando desde la región anterior hasta la posterior

del individuo. Para determinar su sexo, se llevó a cabo una evaluación visual del color del manto con el objetivo de clasificarlos en tres grupos (machos, hembras o indefinidos). Se identificaron como machos aquellos individuos cuyo manto mostraba un color blanco, las hembras aquellas que presentaban un color anaranjado y como indefinidos aquellos ejemplares cuyo sexo no pudo determinarse con certeza. Finalmente, se colocaron los 9 grupos resultantes en bolsas separadas y fueron almacenados en el congelador a -80 °C.

3.2. Optimización del proceso de extracción (Box-Behnken)

El modelo estadístico Box-Behnken se utilizó para optimizar las condiciones de extracción en el experimento (Ferreira *et al.*, 2007), con la finalidad de determinar la combinación óptima de condiciones para la extracción de péptidos antimicrobianos. Para ello, se evaluaron distintos los valores de ratio (g analito/ml disolvente), de tiempo de maceración (h) y potencia de ultrasonidos (J/ml), cada uno de ellos asociado a un código de tres valores (-1, 0 y 1) que corresponden a los tres niveles (bajo, medio y alto) de cada condición. La búsqueda de una condición de extracción óptima se basa en los resultados obtenidos de tres variables respuesta de interés en cada uno de los extractos. Las tres variables respuesta que se seleccionan en este estudio son: la capacidad antibacteriana, ya que el objetivo principal es la obtención de extractos con esa actividad biológica; el contenido de proteína, debido a que la hipótesis de la que se parte es que dicha actividad sea debida a la presencia de péptidos antimicrobianos en el tejido de mejillón y finalmente la capacidad antioxidante, que se espera que esté disminuida en los extractos con mayor capacidad antibacteriana. Por último, se lleva a cabo la obtención de un extracto con las condiciones óptimas predichas por el modelo y se comprueban los resultados de manera experimental. En la tabla 1 aparecen las condiciones de extracción utilizadas junto con el código de valores y niveles asociados a cada uno de los extractos.

Tabla 1. Niveles de variables y condiciones utilizados en el diseño experimental del método estadístico de Box-Behnken para la optimización de extractos de mejillón.

EXTRACTO	RATIO (g analito/ml disolvente)	TIEMPO (h)	ULTRASONIDOS (J/ml)
1	-1 (1/10)	-1 (2)	0 (100)
2	1 (1/40)	-1 (2)	0 (100)
3	-1 (1/10)	1 (24)	0 (100)
4	1 (1/40)	1 (24)	0 (100)
5	-1 (1/10)	0 (8)	-1 (50)
6	1 (1/40)	0 (8)	-1 (50)
7	-1(1/10)	0 (8)	1 (150)
8	1 (1/40)	0 (8)	1 (150)
9	0 (1/25)	-1 (2)	-1 (50)
10	0 (1/25)	1 (24)	-1 (50)
11	0 (1/25)	-1 (2)	1 (150)
12	0 (1/25)	1 (24)	1 (150)
13	0 (1/25)	0 (8)	0 (100)
14	0 (1/25)	0 (8)	0 (100)
15	0 (1/25)	0 (8)	0 (100)

3.3. Extractos de mejillón

El estudio se realizó sobre el grupo de individuos de hembras medianas, dado que fue el más abundante. Este grupo fue seccionado en pequeños fragmentos uniformes de 4 x 4 mm aproximadamente y mezclado en un mismo recipiente con el fin de homogenizar las muestras y minimizar la variabilidad. Debido a las pequeñas cantidades disponibles y la textura de los cuerpos otros métodos disponibles de homogeneización disponibles mostraron ser ineficientes.

Desde el inicio hasta la finalización del experimento se utilizó exclusivamente material de vidrio para evitar la posible contaminación por residuos de materiales plásticos, así como evitar la degradación de estos materiales provocada por la interacción con los disolventes orgánicos empleados. También se destaca que todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de baja temperatura, utilizando hielo de manera constante. Este enfoque se adoptó para minimizar la evaporación de los disolventes involucrados, así como la degradación de los componentes a extraer.

El diseño del experimento consistió en la obtención de 15 extractos de mejillón con diferentes condiciones de extracción mediante la modificación de las siguientes variables continuas: ratio analito/disolvente (g analito/ml disolvente), tiempo de maceración (h) y potencia de ultrasonidos (J/ml). Para cada una de las variables se utilizaban tres niveles distintos: ratios de analito/disolvente de 1/10, 1/25 y 1/40; tiempos de maceración de 2, 8 y 24 h; y potencias de ultrasonidos de 50, 100 y 150 J/ml. Las condiciones de cada extracto estaban

determinadas por el diseño estadístico Box-Behnken, el cual asigna los valores anteriores a las variables de manera aleatoria para la obtención de 15 condiciones de extracción que permitan predecir las condiciones óptimas para llevar a cabo el proceso de extracción en base a los parámetros que serán determinados a posteriori para cada uno de ellos.

La preparación de los extractos se inició mediante la determinación precisa de la masa de tejido de mejillón requerida para cada muestra, empleando una balanza de alta precisión. Se seleccionó una mezcla de diclorometano y metanol (1:1, v/v) como solvente orgánico, con un volumen de 25 ml para cada extracción, previamente enfriado a una temperatura de -20 °C antes de su uso. La elección de esta combinación de solventes se basó en su capacidad comprobada para extraer compuestos bioactivos de invertebrados marinos (Ruiz-Torres *et al.*, 2019). El tejido fue mezclado con el disolvente en un vaso de precipitados para homogeneizar. Se utilizó el dispersor T25 digital Ultra-turrax para triturar y homogeneizar la combinación de disolvente y tejido. Después, a la muestra homogeneizada se le aplicó la potencia de ultrasonidos correspondiente, mediante el sonicador de Hielscher UP400St equipado con un sonotrodo S24d7 de titanio (7 mm de diámetro), utilizando en todo momento un baño de hielo. Por último, se incubó el extracto en la nevera en agitación a una temperatura de 4 °C para permitir que macerara el tiempo establecido.

Una vez transcurridas las horas de maceración, los extractos (n = 15), los cuales estaban formados por tejido y disolvente, se sometieron a filtración mediante una bomba a vacío para eliminar la parte sólida. Este paso permitió guardar el extracto en un matraz redondo de 100 ml apto para utilizarlo durante el proceso de evaporación. A continuación, para eliminar el disolvente (diclorometano y metanol), se utilizó evaporación con rotavapor (Buchi, R-100), a una temperatura de baño de 37 °C. Aunque el rotavapor evaporó todo el disolvente orgánico, algunas gotas de agua presentes en el tejido del mejillón persistieron en el extracto, requiriendo un proceso adicional de desecación en estufa a 40 °C durante 24 h. Los extractos desecados y adheridos al matraz se disolvieron hasta alcanzar una concentración de 20 mg/ml con dimetilsulfóxido (DMSO), disolvente orgánico polar empleado en preparaciones biológicas. Todos los extractos fueron almacenados en viales de vidrio a una temperatura de -20 °C y, por último, se filtraron con un filtro de 0,22 µm.

3.4. Determinación del rendimiento de la extracción

La proporción de agua en el tejido de mejillón es un factor clave que afecta el rendimiento para optimizar la extracción. En primer lugar, se llevó a cabo la determinación de la proporción de agua y de tejido de individuos de mejillón mediante un procedimiento estándar que implicó el secado por triplicado de muestras de mejillón, cada réplica con una masa de 2,5 g, extendida en un portaobjetos. Las réplicas fueron desecadas en una estufa a 40 °C durante un periodo de 24 h, lo que permitió calcular la diferencia de peso entre el tejido húmedo y seco del mejillón, así como la proporción (%) de agua y de tejido.

Contenido de agua (%) se calculó según la siguiente fórmula:

$$CONTENIDO DE AGUA (\%) = \frac{P_f}{P_i} \times 100$$

donde P_f corresponde al peso final tras del proceso de secado, y P_i a la cantidad de tejido húmedo utilizado en cada réplica (2,5 g).

Para calcular el rendimiento de los extractos ($n = 15$), se empleó el peso inicial estimado (P_e), el cual representa el peso seco estimado utilizado en cada extracto. Esta estimación se calculó utilizando la media de peso seco obtenida a partir de las tres réplicas mencionadas anteriormente. Por tanto, se estimó el peso seco de cada extracto teniendo en cuenta los pesos húmedos correspondientes. El peso final (P_f) se define como la cantidad de extracto seco obtenido después de someterlo a los procesos de evaporación en rotavapor y desecación en estufa (24 h, 40 °C).

El rendimiento de extracción (%) se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN (\%)} = \frac{P_f}{P_e} \times 100$$

3.5. Caracterización de los extractos

3.5.1. Espectros de absorción UV-Vis

Los espectros de absorción de los extractos se monitorearon utilizando un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-2700) de absorción molecular UV-visible con un detector de doble haz. Se realizaron medidas de absorción UV-Vis en el rango de longitud de onda desde 200 a 600 nm con intervalos de resolución de 1.0 nm y velocidad *scan speed medium*, empleando celdas de cuarzo para la adquisición de datos de la espectrometría UV-Vis de los extractos. La preparación de las muestras para medir la absorbancia comenzó suspendiendo una alícuota de 50 μ l de cada uno de los extractos iniciales (20 mg/ml) en un volumen de 3 ml de DMSO obteniendo una concentración de 6,66 mg/ml. Además, se realizó una calibración utilizando DMSO como blanco y se registró su espectro UV-Vis con el fin de evaluar si la absorbancia del disolvente interfería a la de los extractos. Se observó que la absorción del DMSO se detecta hasta una longitud de onda de 260 nm, en consecuencia, los espectros de los extractos se obtuvieron a partir de este valor.

3.5.2. Espectrometría de masas (HPLC-MS)

El estudio de cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas (HPLC-MS) se realizó para los 15 extractos de mejillón a partir de una concentración de 5 mg/ml y diluciones de 1:100 y 1:1000. El análisis se llevó a cabo utilizando un equipo Shimadzu LCMS-8050 (Shimadzu, Kioto, Japón) compuesto por un cromatógrafo HPLC que incluye dos bombas unitarias, una unidad desgasificadora, un inyector automático, un horno termostatzado y un detector diodo array, acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (QqQ) equipado con una interfase de ionización por electrospray (ESI), utilizando el software LabSolutions de Shimadzu para el procesamiento de los datos. La separación cromatográfica se realizó en una columna Poroshell con cadenas hidrocarbonadas de 18 carbonos unidas a la resina de sílica, con un tamaño de partícula de 2,7 μ m (Poroshell 120 RP-C18 2,7 μ m, 4,6 x 150 mm) de Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos), además de una precolumna SD-C18 4,6 x 5 mm de 2,7 μ m de tamaño de partícula de Agilent. Esta columna

contaba con un sistema de fase móvil binaria que consiste en el solvente A (0,1 % ácido fórmico/H₂O) y el solvente B (acetonitrilo/0,1 % ácido fórmico). Se empleó un gradiente lineal que incrementó de 0 a 100 % de B en un periodo de 0 a 65 min, seguido de una fase de mantenimiento al 100 % de B durante los últimos 5 min para la recalibración antes de la siguiente inyección. La velocidad de flujo se estableció en 0,5 ml/min, la temperatura de la columna fue de 40 °C y el volumen de inyección fue de 1 µl.

3.6. Determinación del contenido proteico

El análisis de la concentración proteica en los extractos de mejillón se llevó a cabo utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA). Este ensayo colorimétrico se basa en la formación de un cromóforo de Cu⁺¹ (BCA)₂ que desarrolla un color púrpura en proporción a la cantidad de proteína (mg/ml) presente en la muestra. La concentración de proteína se determina midiendo la absorbancia del complejo formado a una longitud de onda de 570 nm, estableciendo así una correlación directa entre la absorbancia medida y la concentración de proteína en la muestra (Bainor *et al.*, 2011).

Previo al ensayo, se preparó la curva patrón (A-P), formada por BSA (6 mg/ml) junto con agua destilada en diferentes proporciones. Los extractos de mejillón se diluyeron a una concentración de 5 mg/ml y todas las muestras se realizaron en triplicado.

Para estimar la concentración de proteína, se utilizaron placas de 96 pocillos a las cuales se le añadieron 250 µl de soluciones de dos reactivos de BCA de color azulado (Reactivo A (Thermofisher, ref. 23228) con el reactivo B (Termofisher, ref. 22324)) en una proporción 50:1. En los pocillos correspondientes a la curva estándar se pipetearon 2,5 µl de cada punto de la curva junto con 2,5 µl de DMSO. Para los pocillos que presentaban el extracto, se añadieron 2,5 µl de H₂O destilada junto con 2,5 µl de extracto. Además, se incluyeron tres pocillos adicionales con 2,5 µl de DMSO y 2,5 µl de agua destilada para comprobar la influencia del disolvente DMSO en las mediciones. Seguidamente, la placa se incubó a 37 °C durante 30 min en un agitador térmico y, posteriormente, se midió la absorbancia de las soluciones a 570 nm, utilizando un lector de placas (*Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader* (Biotek, Alemania). Por último, el análisis de los datos resultante de este ensayo se procesó en Excel.

Adicionalmente, también se evaluó cuánto influye el color anaranjado de los extractos de mejillón en la absorbancia total a esta longitud de onda. En este ensayo se sustituyó el reactivo B por agua destilada, inhibiendo la reacción y permitiendo determinar cuánta absorción era atribuible al color del extracto. De esta forma, se garantizó que la absorbancia medida reflejaba únicamente la cantidad de proteína presente, sin interferencias del propio color del extracto. En el procesamiento de los datos se restó la influencia del color de los extractos para obtener una cuantificación de proteína más precisa.

3.7. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos de mejillón fue evaluada mediante la técnica de decoloración de cationes radicales ABTS denominada TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) (Arts *et al.*, 2004). Este método se basa en la reducción de los radicales ABTS⁺ por los compuestos presentes en los extractos de mejillón, en comparación con el estándar antioxidante hidrofílico Trolox. Inicialmente, se preparó una solución que

consistía en 2 ml de agua destilada, 605 μ l de persulfato de potásico y ABTS en pastilla. Esta solución se incubó durante 24 h en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia de la solución se midió diluyéndola en agua destilada hasta alcanzar una absorbancia de aproximadamente $714 \pm 0,02$ u.a.

Además, se construyó una recta de calibración con 11 puntos utilizando una mezcla de Trolox 1 mM y agua destilada, variando la concentración de Trolox de menor a mayor en cada punto.

Para la medición de la absorbancia de los extractos, se utilizó una placa de 96 pocillos (*Costar*), donde cada uno contenía un volumen de 200 μ l de la solución de ABTS, además de 20 μ l de extracto de mejillón (5 mg/ml) o de la solución de la recta de calibración.

Las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo utilizando un lector de placas (*Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader* (Biotek, Alemania)), realizando una medida inicial de la placa con la solución de ABTS y una medición final correspondiente a la absorbancia de los extractos. El porcentaje de inhibición de la absorbancia se calcula y representa en función de la concentración de Trolox para los datos de la recta patrón, preparados anteriormente. En este ensayo se midió como blanco el disolvente DMSO. Además, todas las lecturas se realizaron por triplicado y en ausencia de luz, con el objetivo de determinar la capacidad antioxidante en mmoles de Trolox /100 g extracto seco.

Además, se realizó un ensayo colorimétrico para evaluar el impacto del color anaranjado de los extractos de mejillón en la absorbancia. En este ensayo, no se utilizó el reactivo de color (ABTS), permitiendo determinar cuánta absorción era atribuible al color del extracto en sí. De esta forma, se garantizó que la absorbancia medida reflejaba únicamente la capacidad oxidante de la muestra, sin interferencias del propio color del extracto.

3.8. Ensayo de la actividad antibacteriana

Se estudió la actividad antibacteriana de los extractos de mejillón contra la bacteriana Gram-negativa *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* utilizando el método de difusión en placas de 96 pocillos con fondo redondo. La bacteria utilizada se cultivó en medio de agar Mueller Hinton (MH) a una temperatura de 28°C durante la noche. La concentración bacteriana empleada en el ensayo fue una dilución 1:100 de una suspensión 0,5 McFarland, equivalente a 5×10^5 unidades formadoras de colonia (UFC) por ml.

Para la preparación de los extractos de mejillón, se utilizó una concentración inicial de 20 mg/ml. Se realizaron diluciones seriadas a la mitad en medio MH por columnas, distribuyendo 50 μ l de cada dilución en los pocillos correspondientes. Posteriormente, se añadieron 50 μ l de la suspensión bacteriana a cada pocillo, resultando en un volumen final de 100 μ l por pocillo y concentraciones finales del extracto reducidas a la mitad. Las placas se incubaron a 28°C durante la noche. La determinación del crecimiento bacteriano y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se realizó visualmente. Además, el ensayo se realizó por triplicado para garantizar la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados.

Se utilizaron varios controles en el ensayo para asegurar la validez de los resultados obtenidos. En primer lugar, se empleó una suspensión diluida de bacterias solamente para verificar el crecimiento bacteriano sin la presencia de extractos ni antibióticos. Además, se utilizó medio MH solamente para asegurar que el medio de cultivo no presentara contaminación ni interferencia en el ensayo. También se incluyó una dilución del extracto a 0,625 mg/ml solamente para evaluar cualquier efecto intrínseco del extracto a esta concentración específica en

ausencia de bacterias. Para comparar la efectividad antibacteriana del extracto con un antibiótico conocido, se realizaron diluciones seriadas de gentamicina, partiendo de una concentración inicial de 8 µg/ml, que se probaron con la suspensión bacteriana testada. Asimismo, se hicieron diluciones seriadas de DMSO, partiendo de DMSO puro, y se probaron con la suspensión bacteriana para evaluar cualquier efecto del solvente en el crecimiento bacteriano.

4. RESULTADOS

4.1. Ajuste de las condiciones experimentales de extracción

Los 15 extractos de mejillón se procesaron bajo tres condiciones de extracción predefinidas. Sin embargo, debido a la dificultad de obtener la cantidad exacta de tejido en una balanza de precisión, las condiciones de extracción variaron. En consecuencia, el volumen y la potencia de ultrasonidos se ajustaron en función de la cantidad exacta de tejido pesado en cada extracto (Tabla 2).

Posteriormente, se calcularon los valores medios del extracto seco obtenido en función de la cantidad de tejido utilizado en cada extracto. Los valores medios del extracto seco fueron $0,05 \pm 0,02$ g, $0,08 \pm 0,02$ g y $0,14 \pm 0,04$ g para 0,625 g, 1 g y 2,5 g de tejido utilizado, respectivamente.

Tabla 2. Valores reales de las condiciones de extracción utilizados en los 15 extractos de mejillón.

EXTRACTO	CONDICIONES DE EXTRACCIÓN REALES			
	TEJIDO (g)	VOLUMEN (ml)	TIEMPO (h)	ULTRASONIDOS (J)
1	2,49	24,9	2	2492
2	0,69	27,4	2	2740
3	2,69	26,9	24	2694
4	0,66	26,3	24	2630
5	2,54	25,4	8	1267
6	0,63	25,2	8	1260
7	2,59	25,9	8	3884
8	0,66	26,5	8	3976
9	1,07	26,7	2	1333
10	1,26	31,4	24	1568
11	1,01	25,1	2	3770
12	1,04	26,0	24	3900
13	1,13	28,3	8	2827
14	1,12	28,1	8	2810
15	1,12	28,0	8	2795

4.2. Determinación del rendimiento de la extracción

Mediante la realización del triplicado para determinar la proporción de tejido y agua en la especie de mejillón *M. galloprovincialis*, los resultados indican un promedio de 23,4±0,6 % de tejido y 76,6±0,6 % de agua, presentados en la Tabla 3.

Tabla 3. Proporción de tejido y agua presentes en la especie de mejillón *Mytilus galloprovincialis*.

RÉPLICA	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)	CANTIDAD TEJIDO (%)	CANTIDAD AGUA (%)
1	2,5	0,59	23,7	76,3
2	2,6	0,61	23,8	76,2
3	2,7	0,61	22,8	77,2
MEDIA±DES.EST.	2,6 ± 0,1	0,60 ± 0,01	23,4 ± 0,6	76,6 ± 0,6

Los datos empleados para calcular el rendimiento de extracción se encuentran detallados en la Tabla 4. Entre los extractos evaluados, el extracto 6 exhibió el rendimiento más alto, alcanzando un 46,7 %, mientras que el extracto 3 registró el rendimiento más bajo, con un 16,8 %. Los valores promedio de rendimiento para las diferentes cantidades de tejido utilizadas fueron los siguientes: $33,3 \pm 12,1$ % para 0,625 g, $32,1 \pm 6,0$ % para 1 g, y $23,1 \pm 6,5$ % para 2,5 g de tejido.

Tabla 4. Valores de peso inicial seco estimado, peso final y rendimiento de los 15 extractos de mejillón.

EXTRACTO	PESO INICIAL SECO ESTIMADO (g)	PESO FINAL (g)	RENDIMIENTO (%)
1	0,58	0,11	18,3
2	0,16	0,03	17,4
3	0,63	0,11	16,8
4	0,15	0,05	33,1
5	0,59	0,17	28,8
6	0,15	0,07	46,7
7	0,61	0,17	28,7
8	0,16	0,06	36,1
9	0,25	0,08	31,2
10	0,29	0,10	35,6
11	0,24	0,08	34,0
12	0,24	0,07	27,5
13	0,26	0,06	23,8
14	0,26	0,08	30,4
15	0,26	0,11	42,4

4.3. Caracterización de los extractos

En la Figura 1 se muestra los espectros de absorción UV-Vis de los 15 extractos medidos con el objetivo de analizar las diferencias y similitudes en la presencia de diversos compuestos, según las condiciones de extracción aplicadas. Los espectros obtenidos presentan gran variabilidad a pesar de tener varios máximos de absorbancia comunes. En particular, se identifican máximos de absorción recurrentes en los rangos de longitud de onda de 271-278 nm, 327-329 nm, 418-419 nm y 460-467 nm. El resultado más alto de máximo de absorbancia se registró en 565 nm para el extracto 4. Sin embargo, los resultados sugieren que las condiciones de extracción no están directamente relacionadas con la aparición de los máximos de absorbancia observados y, por consiguiente, con la presencia de los posibles compuestos identificados.

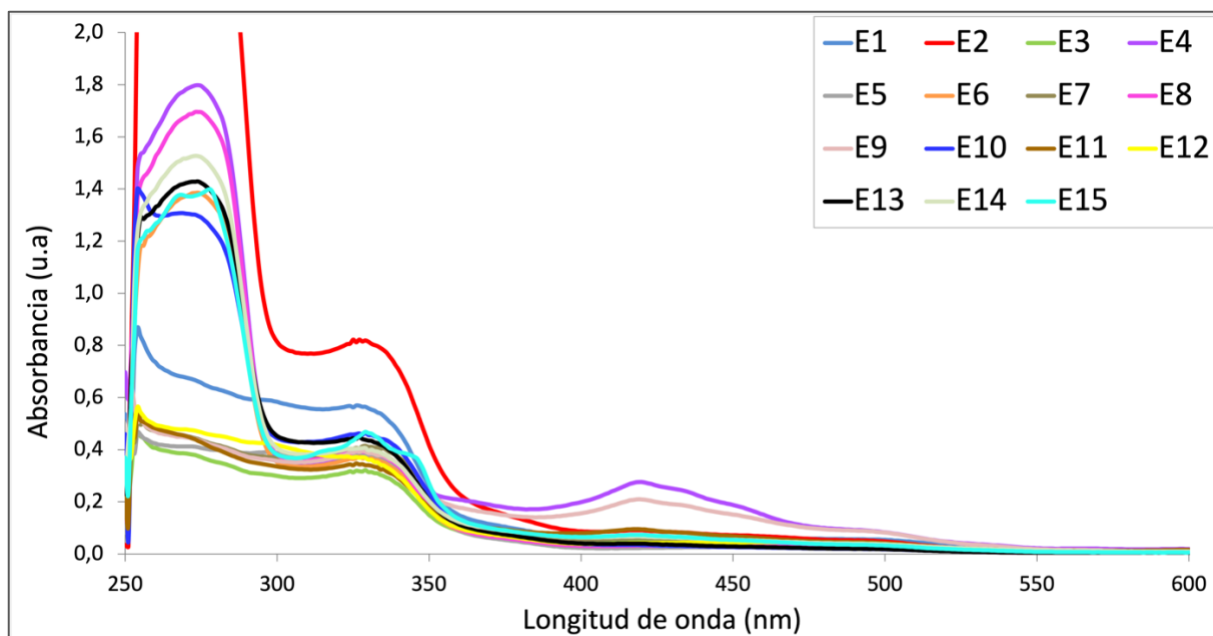


Figura 1: Espectros de absorción UV-Vis de los 15 extractos de mejillón (6,66 mg/ml) en DMSO.

El análisis mediante HPLC-MS de los 15 extractos de mejillón reveló los cromatogramas que, a pesar de la variabilidad de los extractos, estos presentan cromatogramas similares. Se presenta el cromatograma del extracto 5, diluido a una concentración de 1:1000 (Figura 2), como representativo de los demás.

Respecto al análisis de los picos más prominentes, aparecen varios picos significativos que sugieren diferentes compuestos presentes en la muestra. Se destaca, en particular, un pico de alta intensidad aproximadamente en el minuto 6, y otro pico de menor intensidad alrededor del minuto 10, ambos consistentes en todos los cromatogramas analizados. La intensidad de los picos, representada en el eje Y, proporciona una medida cuantitativa relativa de estos compuestos. Es notable que los picos menores también pueden indicar la presencia de compuestos en menor concentración o aquellos con menor respuesta del detector. Sin embargo, a partir del minuto 21, se observa un aumento considerable en el ruido, seguido de una saturación del cromatograma debido a la abundancia de compuestos de elevado peso molecular presentes en los extractos.

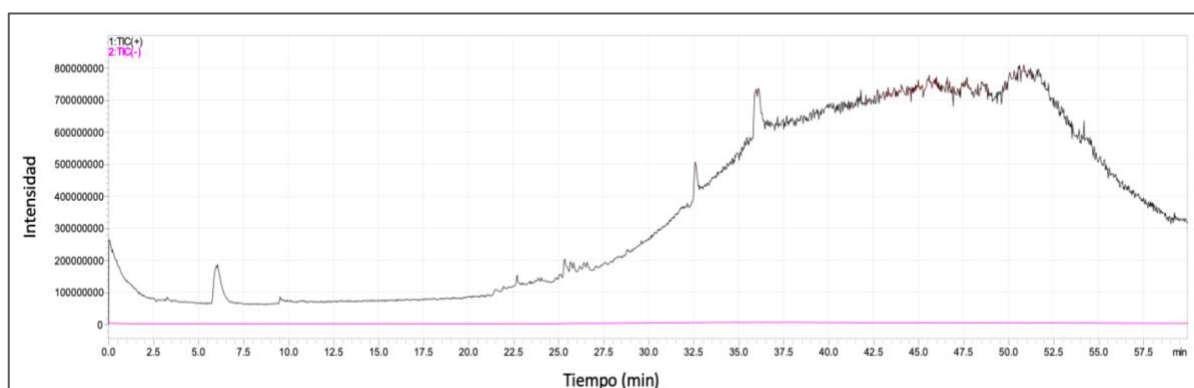


Figura 2: Cromatograma de HPLC-MS del extracto 5 (TIC +).

4.4. Determinación del contenido proteico

Se utilizó un ensayo BCA para determinar el contenido de proteína (mg/ml) presente en los extractos de mejillón. La Figura 3 muestra los resultados obtenidos. La concentración media de proteína obtenida para los extractos es de 1,68 mg/ml. Los extractos 11, 12, 13, 14 y 15 se destacan por haber obtenido la mayor concentración de proteína.

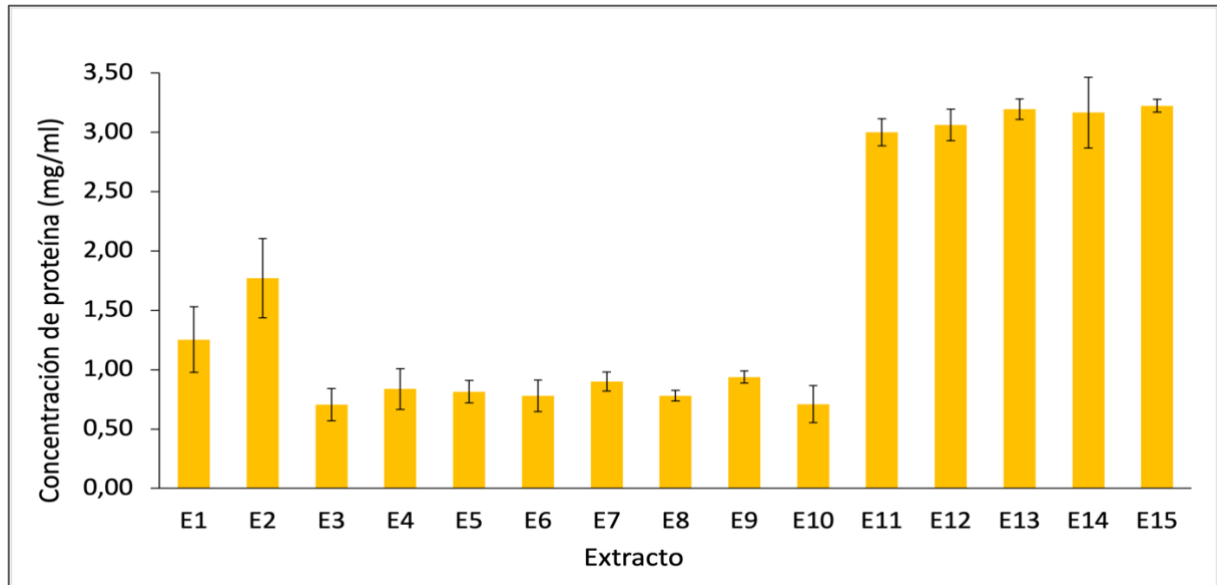


Figura 3: Concentración media de proteína (mg/ml) de los 15 extractos de mejillón (5 mg/ml).

4.5. Determinación de la capacidad antioxidante

Se determinaron los niveles de actividad antioxidante en los 15 extractos, expresados en mmoles de Trolox/100 g extracto seco. Los resultados obtenidos se han representado en la Figura 4. La mayoría de los extractos presentaron niveles de actividad antioxidante en el rango de 2,00 a 3,50 mmoles de Trolox/100 g extracto seco. Sin embargo, los extractos con mayor nivel de actividad antioxidante fueron, el extracto 2 con un valor de $6,34 \pm 0,31$, seguido por el extracto 5 con $4,67 \pm 0,38$ y, por último, el extracto 1 con $4,17 \pm 0,38$. Por otro lado, los extractos 11 y 15 mostraron los niveles más bajos de actividad antioxidante, con un valor de $1,95 \pm 0,05$ y $1,94 \pm 0,11$ respectivamente.

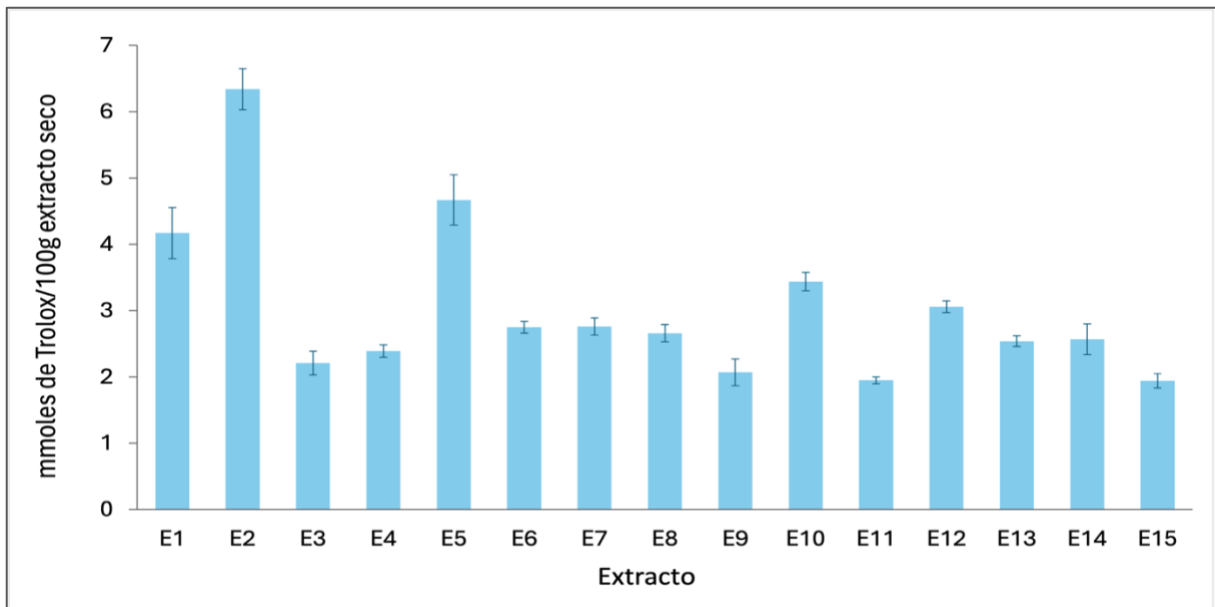


Figura 4: Capacidad antioxidante (mmoles de Trolox/100 g extracto seco) de los 15 extractos de mejillón (5 mg/ml).

4.6. Determinación de la actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de los extractos de mejillón fue evaluada frente a la bacteria *Aeromonas salmonicida*, demostrando una inhibición del crecimiento bacteriano en todos los casos. Los resultados obtenidos para cada extracto se presentan en la Figura 5. La comparación de los 15 extractos permitió observar que aquellos que demostraron una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 2,5 mg/ml fueron los más efectivos en inhibir el crecimiento bacteriano, ya que requerían la menor concentración de extracto. En contraste, los extractos con valores de CMI superiores a 5 mg/ml resultaron menos efectivos, necesitando una mayor concentración para inhibir el crecimiento de la cepa bacteriana examinada.

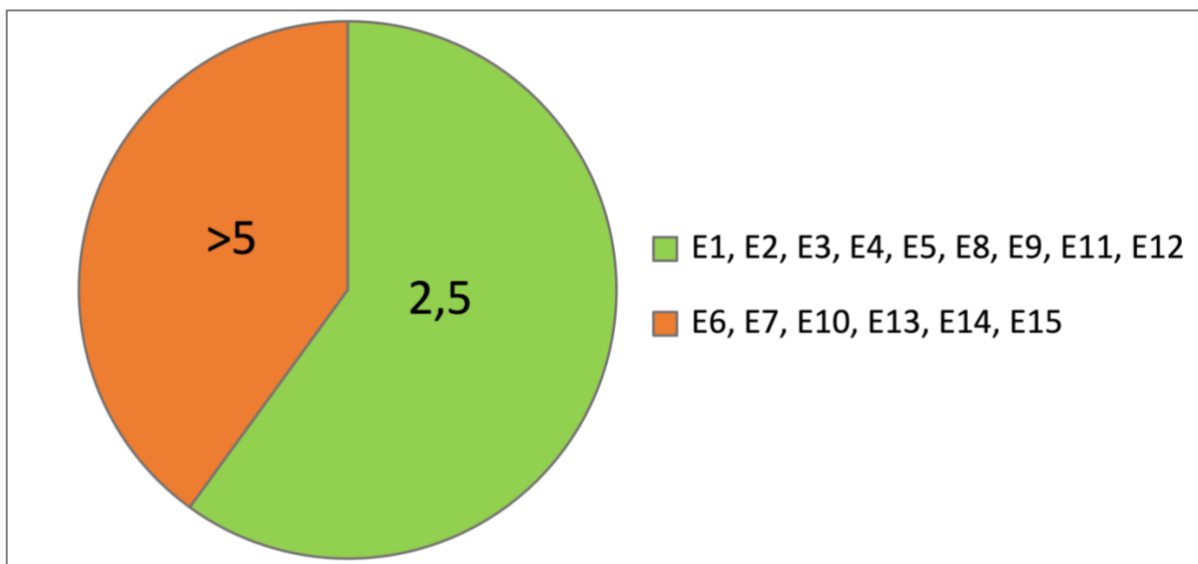


Figura 5: Actividad antibacteriana (Valor CMI (mg/ml)) de los 15 extractos de mejillón frente a *Aeromonas salmonicida*.

4.7. Optimización del proceso de extracción

Enfocando el modelo estadístico Box-Behnken en las respuestas de capacidad antibacteriana, la Figura 6 muestra gráficas 2D y 3D que representan la relación entre dos condiciones de extracción y su efecto en la capacidad antibacteriana de los extractos de mejillón. En las gráficas 2D las zonas de color rojo-naranja representan las condiciones de extracción para las que la capacidad antibacteriana es mayor. En las gráficas 3D, la pendiente de la superficie espacial de cada figura indica el grado de influencia de las condiciones de extracción en la capacidad antibacteriana donde sus valores máximos están representadas por los vértices de la superficie.

En la gráfica A y B se observa la influencia del ratio y el tiempo sobre la capacidad antibacteriana. El modelo estadístico predice que la mayor capacidad antibacteriana se produce en tiempos de maceración cortos (2-3 h) independientemente del ratio utilizado. Además, también se observan máximos de capacidad antibacteriana para tiempos de maceración prolongados (22-24 h) con valores de ratio tanto bajos como altos.

En la gráfica C y D se muestra la influencia del ratio y la potencia de ultrasonidos sobre la capacidad antibacteriana. Para estas gráficas, el modelo predice que la mayor capacidad antibacteriana se alcanza únicamente para potencias de ultrasonidos bajas (50 J/ml) cuando se lleva a cabo la utilización de valores medios-altos de ratio (0,05-0,08).

En la gráfica E y F se muestra la influencia de la potencia de ultrasonidos y el tiempo de maceración sobre la capacidad antibacteriana. El modelo predice que la máxima capacidad antibacteriana se produce en tiempos cortos (2-8 h) con potencia de ultrasonidos bajas (50 J/ml) y, por otro lado, a tiempos largos (22-24 h) con potencia de ultrasonidos alta (120 J/ml)

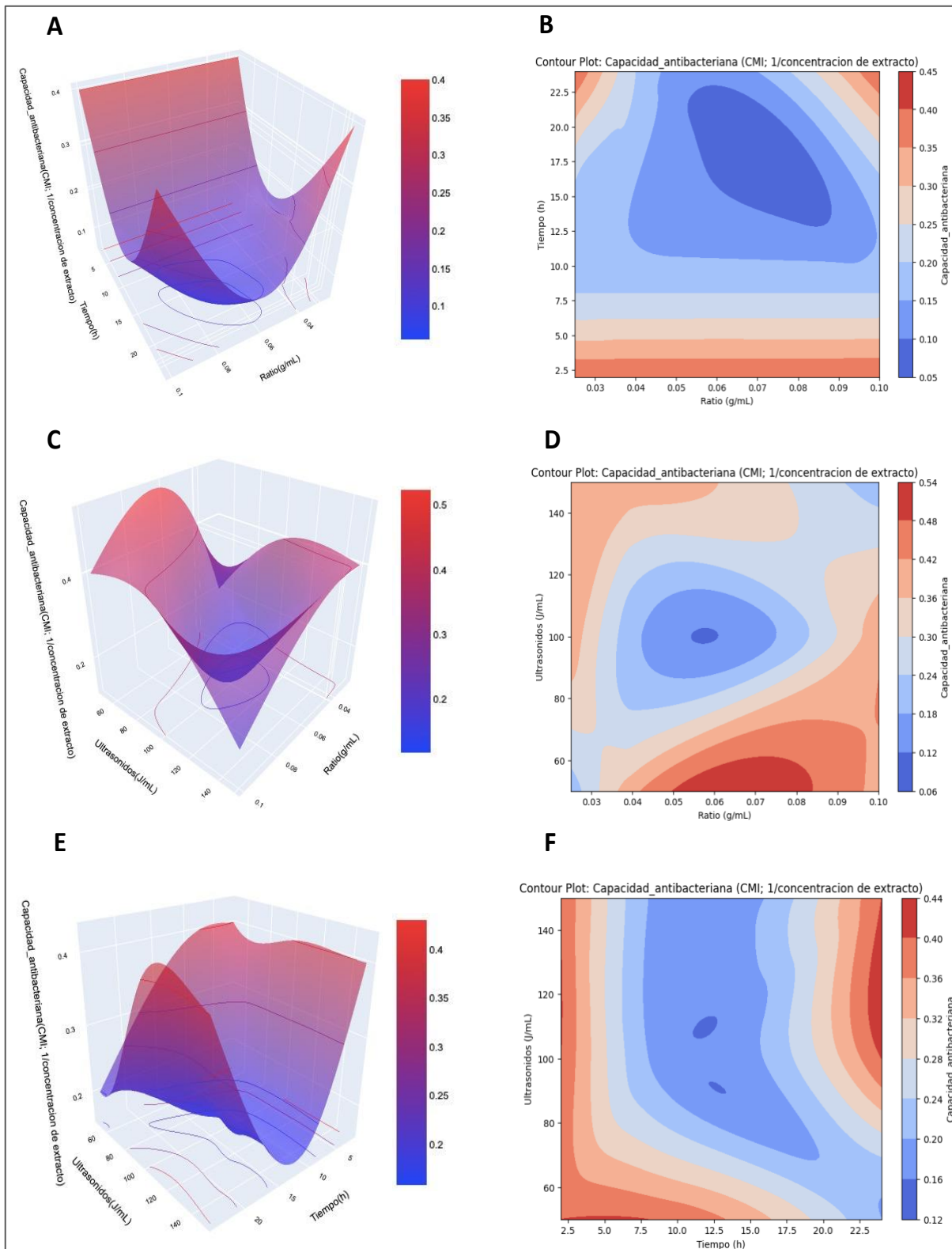


Figura 6: Gráficas 2D de contorno y 3D de superficie de respuesta para la capacidad antibacteriana. (A, B) Efecto del ratio y del tiempo sobre la capacidad antibacteriana de los extractos de mejillón. (C, D) Efecto del ratio y del ultrasonidos sobre la capacidad antibacteriana de los extractos de mejillón. (E, F) Efecto del ultrasonidos y del tiempo sobre la capacidad antibacteriana de los extractos de mejillón.

La Figura 7 muestra una gráfica de dispersión 3D en la que cada uno de los puntos representados se corresponde con una condición de extracción generada por el modelo Box-Behnken.

En la gráfica se observa la relación que predice el modelo entre las tres variables respuestas utilizadas para la optimización del proceso de extracción. Al igual que en la sección anterior nos vamos a centrar en maximizar la capacidad antibacteriana de los extractos. En este caso, los resultados observados muestran que la capacidad antibacteriana aumenta conforme la cantidad de proteína disminuye y la capacidad antioxidante aumenta en los extractos. Esta representación, también nos permite determinar el punto óptimo donde se alcanza la mayor capacidad antibacteriana. En este punto, las condiciones de extracción que permiten alcanzar la mayor capacidad antibacteriana según el modelo estadístico Box-Behnken son las siguientes: potencia ultrasónica, 50 J/ml; ratio, 1/10; tiempo de extracción, 2 h. Asimismo, también se predicen los valores de respuesta de contenido de proteína (0,45 mg/ml), capacidad antibacteriana (0,56) y capacidad antioxidante (5,21 mmoles de Trolox/100 g extracto seco). El valor de capacidad antibacteriana de la figura correspondería a un valor CMI de 1,78 mg/ml.

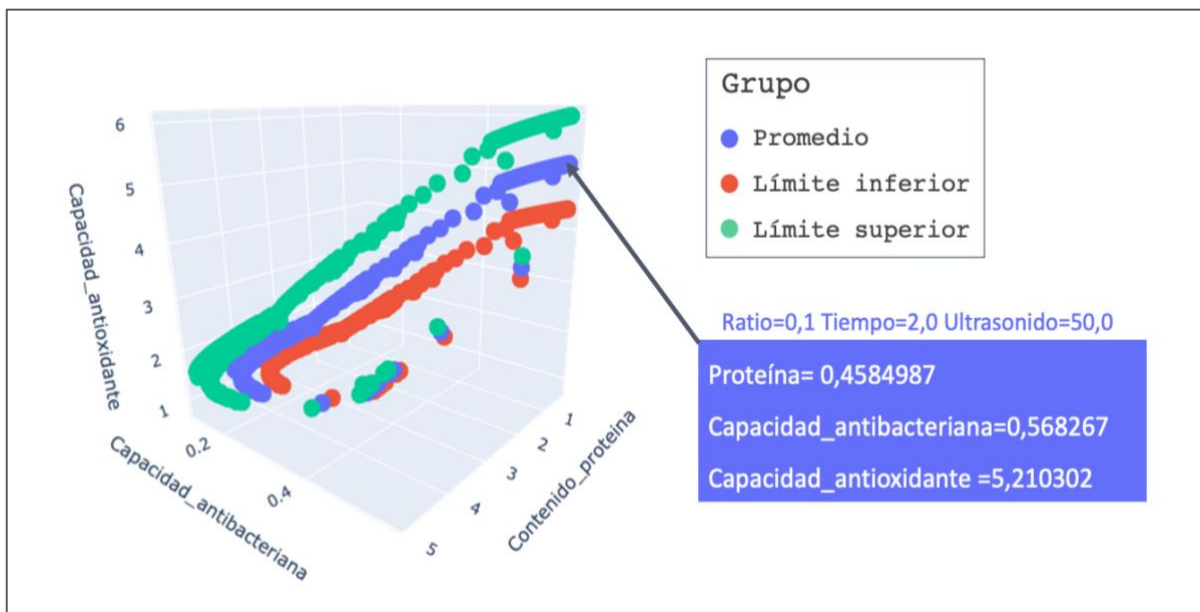


Figura 7: Gráfica de dispersión 3D sobre la relación entre el contenido de proteína, la capacidad antibacteriana y la capacidad antioxidante en el proceso de extracción del mejillón.

Por último, se obtuvo el extracto (n = 3) empleando las condiciones determinadas por el modelo para la validación de los resultados obtenidos. La tabla 5 muestra los resultados de predicción del modelo estadístico y los resultados experimentales de la capacidad antioxidante, contenido de proteína y capacidad antibacteriana del extracto optimizado.

Tabla 5. Resultados predichos y experimentales de la capacidad antioxidante, contenido de proteína y capacidad antibacteriana del extracto optimizado obtenido por el modelo estadístico Box-Behnken,

	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (mmoles de Trolox/ 100 g extracto seco)	CONTENIDO DE PROTEÍNA (mg/ml)	CAPACIDAD ANTIBACTERIANA (CMI) (mg/ml)
RESULTADOS PREDICTIVOS	5,21	0,45	0,56
RESULTADOS EXPERIMENTALES	4,77 ± 0,23	0,56 ± 0,05	1,25

Por último, se incluye la tabla 6 a modo resumen con las condiciones de los extractos y los resultados de los diferentes análisis y técnicas que se ha obtenido en este estudio, con el fin de poder obtener una visión global y completa de todos los resultados.

Tabla 6. Resumen de las condiciones de los 15 extractos junto a los resultados de las técnicas utilizadas¹.

EXTRACTO	CONDICIONES			RENDIMIENTO (%)	CONCENTRACIÓN PROTEÍNA \pm DES.EST. (mg/ml)	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE \pm DES.EST. (mmoles de Trolox/100 g extracto seco)	VALOR CMI (mg/ml)
	RATIO (mg/ml)	TIEMPO (h)	ULTRASONIDOS (μ /ml)				
1	1/10	2	100	18,3	1,25 \pm 0,28	4,17 \pm 0,38	2,5
2	1/40	2	100	17,4	1,77 \pm 0,33	6,34 \pm 0,31	2,5
3	1/10	24	100	16,8	0,70 \pm 0,14	2,21 \pm 0,18	2,5
4	1/40	24	100	33,1	0,84 \pm 0,17	2,39 \pm 0,09	2,5
5	1/10	8	50	28,8	0,81 \pm 0,09	4,67 \pm 0,38	2,5
6	1/40	8	50	46,7	0,78 \pm 0,13	2,75 \pm 0,09	>5
7	1/10	8	150	36,1	0,90 \pm 0,08	2,76 \pm 0,13	>5
8	1/40	8	150	31,2	0,78 \pm 0,05	2,66 \pm 0,13	2,5
9	1/25	2	50	35,6	0,94 \pm 0,05	2,07 \pm 0,20	2,5
10	1/25	24	50	35,6	0,71 \pm 0,16	3,44 \pm 0,14	>5
11	1/25	2	150	34,0	3,00 \pm 0,11	1,95 \pm 0,05	2,5
12	1/25	24	150	27,5	3,06 \pm 0,13	3,06 \pm 0,09	2,5
13	1/25	8	100	23,8	3,20 \pm 0,09	2,54 \pm 0,08	>5
14	1/25	8	100	30,4	3,17 \pm 0,30	2,57 \pm 0,23	>5
15	1/25	8	100	42,4	3,22 \pm 0,05	1,94 \pm 0,11	>5

¹ Los resultados presentados en esta tabla, aunque previamente expuestos en formato numérico o en gráfica, se incluyen de nuevo para proporcionar una visión global y consolidada de los datos.

5. DISCUSIÓN

Dada la creciente problemática de la resistencia a los antibióticos, es vital investigar nuevas alternativas antibacterianas que reduzcan la dependencia y permitan superar las limitaciones de los antibióticos tradicionales. Un enfoque prometedor es estudiar el sistema inmunitario innato de invertebrados marinos debido a su elevada resistencia a enfermedades provocadas por patógenos. Entre los mecanismos de defensa de este tipo de organismos se encuentra la producción de compuestos antimicrobianos que resultan de gran interés en la búsqueda de nuevas moléculas para el desarrollo de antibióticos de origen natural. El mejillón Mediterráneo, *Mytilus galloprovincialis*, es una especie altamente distribuida que alberga una gran variedad de compuestos antimicrobianos en su sistema inmunitario, especialmente péptidos antimicrobianos (AMP), los cuales han sido objeto de numerosos estudios (Guillaume Mitta *et al.*, 2000; Y.-S. Yang *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2009; Gerdol *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2019). Por esta razón, un análisis más extenso de sus péptidos proporcionaría las herramientas fundamentales para identificar nuevos compuestos capaces combatir comunidades bacterianas de manera efectiva.

En el modelo estadístico Box-Behnken utilizado para optimizar las condiciones de obtención de un extracto con actividad antibacteriana a partir de tejido de mejillón, se han priorizado los resultados obtenidos de capacidad antibacteriana sobre la capacidad antioxidante y el contenido de proteínas. No obstante, los resultados obtenidos para estas dos variables nos permiten discutir si la capacidad antibacteriana observada es debida a los factores hipotetizados al inicio del estudio

Según el modelo, se observa que la capacidad antibacteriana máxima se logra cuando el contenido de proteínas es mínimo. Esta relación inversa sugiere que la capacidad antibacteriana de los extractos obtenidos podría no estar determinada por proteínas o péptidos, si no por la presencia de otros compuestos bioactivos con propiedades antibacterianas, los cuales son liberados durante en el proceso de extracción. Un alto contenido proteico en los extractos podría deberse a la presencia de proteínas de diversa naturaleza, que desempeñan distintos roles en lugar de estar involucradas en la supervivencia del organismo.

Además, se observa que a medida que aumenta la capacidad antibacteriana, también se incrementa la capacidad antioxidante. Esta respuesta podría estar relacionada con la presencia de carotenoides. Los invertebrados marinos, en particular los mejillones, son conocidos por acumular altas cantidades de estos compuestos en sus tejidos, principalmente a través del fitoplancton que constituye la base de su dieta (Maoka *et al.*, 2011). Estos carotenoides, que son responsables de la pigmentación tisular, desempeñan roles cruciales en los invertebrados marinos. Un estudio reciente de Sinha *et al.* (2023) ha demostrado que el β -caroteno actúa como un potente agente antioxidante al neutralizar los radicales libres de oxígeno. Además, este compuesto también ha mostrado propiedades antibacterianas significativas. En el género *Mytilus*, se ha identificado la presencia de 25 tipos diferentes de carotenoides, incluyendo el β -caroteno (Shuang Li *et al.*, 2021), lo que resalta la diversidad y relevancia de estos compuestos en la biología de los mejillones. Estos hallazgos resaltan la importancia de los carotenoides no solo en la defensa antioxidante, sino también en la protección contra infecciones bacterianas. Esto subraya la necesidad de seleccionar y optimizar unas buenas condiciones en el proceso de extracción con el objetivo de extraer compuestos bioactivos, con el fin de aprovechar todas sus propiedades beneficiosas deseadas. En el estudio de Nyaa *et al.* (2009) se optimiza el método de extracción de compuestos bioactivos de

extractos vegetales con capacidad antibacteriana y antioxidante. Por lo tanto, las condiciones de extracción utilizadas en nuestro trabajo son cruciales. Es posible que el uso de los disolventes seleccionados pueda haber favorecido la liberación de compuestos bioactivos con propiedades antibacterianas y antioxidantes, mientras que simultáneamente puede haber reducido o degradado la presencia de péptidos antimicrobianos, que tradicionalmente se consideran responsables de la actividad antibacteriana en los organismos marinos.

El rendimiento de los extractos obtenidos revela que la utilización de mayor ratio de masa de mejillón por mililitro de disolvente conlleva a un rendimiento de extracción menor y viceversa. Esto sugiere que la cantidad de tejido utilizado influye de manera significativa en la eficiencia del proceso de extracción de extracto seco. Varias razones podrían explicar esta relación, como las técnicas específicas de extracción empleadas, los tipos de disolventes utilizados y las características estructurales del tejido del mejillón. Además, es importante considerar que el rendimiento es un parámetro experimental que puede estar sujeto a variaciones debido a posibles errores durante el proceso, los cuales podrían afectar los resultados observados. A pesar de que los extractos 13, 14 y 15 fueron preparados de manera similar y presentan características similares, los rendimientos obtenidos muestran diferencias notables, resaltando la sensibilidad del proceso de extracción a las condiciones variables de experimentación. Además, este estudio reveló que la proporción del tejido y agua del mejillón fue de 23,4 % y 76,6 %, respectivamente. Estos datos concuerdan con las observaciones realizadas por Çelik *et al.* (2012), quienes examinaron estas proporciones en diferentes estaciones del año, sugiriendo que las fluctuaciones estacionales desempeñan un papel determinante en la proporción de tejido y agua de esta especie. Por consiguiente, el rendimiento no es un parámetro que se pueda establecer de forma precisa, ya que es susceptible al error experimental y, además, los valores de rendimiento obtenidos en diferentes épocas variarían.

La caracterización de los extractos fue realizada utilizando un espectrofotómetro de absorción en UV-Vis, con el cual se observaron espectros diferentes, pero con algunos valores máximos similares. Los máximos obtenidos en el rango de 271-278 nm podrían estar asociados a la presencia de ciertos cromóforos como la vitamina E (α -tocoferol quinona) (van Haaften *et al.*, 2001), los máximos entre 327-329 nm podrían ser ácidos insaturados (Badiu *et al.*, 2008) y los observados entre 460-470 nm pueden ser indicativos de una alta concentración de carotenoides, compuestos que han sido detalladamente estudiados por Vershinin (1996).

La observación de picos de absorción relacionados con proteínas no fue posible debido tanto al disolvente utilizado, el cual absorbe en la misma longitud de onda que las proteínas y, por tanto, las enmascara, como por la falta de una técnica específica de extracción de proteínas. El enmascaramiento debido al disolvente utilizado se evidencia en algunos estudios como el de Guillaume Mitta *et al.* (1999), donde se caracterizó la defensina 1, un péptido antimicrobiano observado a una longitud de onda de 225 nm, o en el estudio de Pacor *et al.* (2021) donde se estudiaron las miticalinas, unos péptidos ricos en prolina, los cuales se observaban en el rango de longitud de onda de 200-250 nm. Adicionalmente, se realizó una medición de proteínas utilizando el nanodrop midiendo a 240-260 nm, longitud de onda a la cual absorben estos compuestos. Sin embargo, los resultados no fueron los esperados, ya que el disolvente orgánico utilizado (DMSO) presenta una absorción en este rango, el cual no permitió cuantificar las proteínas presentes, al igual que en los espectros UV-Vis. Estos resultados respaldaron la realización de una técnica alternativa para medir la proteína, que en este caso se llevó a cabo el análisis de BCA.

Continuando con la caracterización de los extractos, se llevó a cabo el procesamiento de las muestras con el objetivo de determinar algunos de los compuestos proteicos concretos responsables de la actividad antibacteriana. Sin embargo, la gran complejidad que supone realizar un análisis de una matriz orgánica de origen biológico impidió obtener resultados concluyentes. Este desafío se debió principalmente a la saturación de los extractos en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), incluso diluyendo la muestra. En los cromatogramas analizados se observa una gran saturación de los extractos en la fase apolar, concluyendo que los posibles componentes responsables podrían ser ácidos grasos con altas masas moleculares presentes en el tejido del mejillón. Esto se respalda en el estudio realizado por Donato *et al.* (2018), donde se extrajeron los lípidos de un extracto de *M. galloprovincialis* utilizando extracciones de lípidos y se determinó que la técnica combinada de HILIC × RP-LC-MS/MS en línea fue un buen método para analizar y separar lípidos polares y neutros. Además, revelaron que este organismo contiene más de 200 tipos de lípidos, destacando la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, como las más abundantes.

Por lo tanto, en nuestro trabajo no fue posible identificar ningún compuesto proteico específico que contribuya a la actividad antibacteriana de los extractos debido a la gran cantidad de lípidos presentes que saturaban el equipo. Los intentos de caracterización proporcionaron valiosa información preliminar sobre la composición compleja de los extractos, subrayando la necesidad de emplear técnicas adicionales como el fraccionamiento de los extractos o su preprocesamiento y purificación para superar las limitaciones actuales.

6. CONCLUSIONES

En conclusión, este estudio destaca la importancia del mejillón Mediterráneo, *M. galloprovincialis*, como una fuente prometedora de compuestos bioactivos con potencial antibacteriano y antioxidante. La aplicación del modelo estadístico Box-Behnken permitió optimizar las condiciones de extracción subrayando la importancia de la proporción de ratio, tiempo de maceración y ultrasonidos. Además, la caracterización de los extractos sugiere la presencia de posibles compuestos bioactivos en el tejido de esta especie de mejillón, conocidos por sus propiedades antioxidantes y antibacterianas.

No obstante, la dificultad para identificar específicamente los péptidos antimicrobianos responsables de la actividad antibacteriana, debido tanto a las técnicas de extracción como a la dificultad de los equipos utilizados, destaca la complejidad de la matriz biológica del mejillón y la necesidad de estrategias avanzadas de fraccionamiento y purificación. Estos métodos podrían ayudar a entender los mecanismos moleculares subyacentes y descubrir nuevos compuestos bioactivos que podrían ser utilizados para combatir patógenos bacterianos que han desarrollado resistencia a los antibióticos convencionales.

En consecuencia, este trabajo proporciona una base inicial para futuras investigaciones dirigidas a explorar y aprovechar la potente fuente bioquímica del mejillón Mediterráneo como una fuente alternativa de agentes antibacterianos naturales.

Además, cabe destacar que el mejillón Mediterráneo presenta un potencial reutilizable significativo, ya que los residuos y descartes de su procesamiento pueden ser aprovechados en futuras aplicaciones dentro de la acuicultura y otras industrias relacionadas, promoviendo así una economía circular y sostenible.

La integración de técnicas analíticas avanzadas y metodologías de extracción mejoradas será crucial para avanzar hacia el desarrollo de terapias antibacterianas efectivas y sostenibles, mitigando así los desafíos globales asociados con la resistencia antimicrobiana.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Aziz, M., Eissa, A. E., Hanna, M., & Okada, M. A. (2013). Identifying some pathogenic Vibrio/Photobacterium species during mass mortalities of cultured Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) from some Egyptian coastal provinces. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1(2), 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2013.10.004>

Abram, Q., Dixon, B., & Katzenback, B. (2017). Impacts of low temperature on the teleost immune system. *Biology*, 6(4), 39. <https://doi.org/10.3390/biology6040039>

Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & Shellfish Immunology*, 90, 210-214. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.066>

Adanech, B. H., & Temesgen, K. G. (2018). Isolation and identification of *Escherichia coli* and *Edwardsiella tarda* from fish harvested for human consumption from Zeway Lake, Ethiopia. *African journal of microbiology research*, 12(20), 476-480. <https://doi.org/10.5897/ajmr2018.8654>

Agnew, W., & Barnes, A. (2007). *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*, 122(1-2), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.002>

Ahmad, A., W. Hassan, S., & Banat, F. (2022). An overview of microalgae biomass as a sustainable aquaculture feed ingredient: food security and circular economy. *Bioengineered*, 13(4), 9521-9547. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2061148>

Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., & Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 733-741. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.038>

Albert, V., & Ransangan, J. (2013). Effect of water temperature on susceptibility of culture marine fish species to vibriosis. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*, 3(3), 48-52.

Alfonso, S., Gesto, M., & Sadoul, B. (2021). Temperature increase and its effects on fish stress physiology in the context of global warming. *Journal of Fish Biology*, 98(6), 1496-1508. <https://doi.org/10.1111/jfb.14599>

Allam, B., & Raftos, D. (2015). Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 121-136. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.005>

Alonso-Rodríguez, R., & Páez-Osuna, F. (2003). Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 219(1-4), 317-336. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(02\)00509-4](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(02)00509-4)

Álvarez-Lires, M. M., Arias-Correa, A., Lorenzo-Rial, M. A., & Serrallé-Marzoa, F. (2017). Educación para la Sustentabilidad: Cambio Global y Acidificación Oceánica. *Formación Universitaria*, 10(2), 89-102. <https://doi.org/10.4067/s0718-50062017000200010>

Arévalo, Z., Clavijo, A. M., Rolo de, M., Álvarez, M., Conroy, D., Infante, D., & Santander, J. (2003). Aislamiento de *Vibrio cholerae* a partir de lisas y tilapias en Venezuela. *Boletín Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(2), 127-130. https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562003000200005&script=sci_arttext

Arts, M. J. T. J., Haenen, G. R. M. M., Voss, H.-P., & Bast, A. (2004). Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 42(1), 45-49. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.08.004>

Badiu, D. L., Balu, A. M., Barbes, L., Luque, R., Nita, R., Radu, M., Tanase, E., & Rosoiu, N. (2008). Physico-Chemical Characterisation of Lipids from *Mytilus galloprovincialis* (L.) and *Rapana venosa* and their Healing Properties on Skin Burns. *Lipids*, 43(9). <https://doi.org/10.1007/s11745-008-3205-2>

Bainor, A., Chang, L., McQuade, T. J., Webb, B., & Gestwicki, J. E. (2011). Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume. *Analytical Biochemistry*, 410(2), 310-312. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.11.015>

Balseiro, P., Falcó, A., Romero, A., Dios, S., Martínez-López, A., Figueras, A., Estepa, A., & Novoa, B. (2011). *Mytilus galloprovincialis* myticin C: A chemotactic molecule with antiviral activity and immunoregulatory properties. *PLoS One*, 6(8), e23140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023140>

Barbosa Solomieu, V., Renault, T., & Travers, M.-A. (2015). Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.011>

Ben Hamed, S., Tavares Ranzani-Paiva, M. J., Tachibana, L., de Carla Dias, D., Ishikawa, C. M., & Esteban, M. A. (2018). Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. *Fish & Shellfish Immunology*, 80, 550-562. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.053>

Buceta, J. C. (2016). La Acuicultura social de bivalvos: un nuevo concepto. *AquaTIC (Zaragoza)*, 0(39). <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/75/64>

Buchmann, K. (2022). Control of parasitic diseases in aquaculture. *Parasitology*, 149(14), 1985-1997. <https://doi.org/10.1017/s0031182022001093>

Burridge, L., Weis, J. S., Cabello, F., Pizarro, J., & Bostick, K. (2010). Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 306(1-4), 7-23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.020>

Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1137-1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>

Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., & Buschmann, A. H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15(7), 1917-1942. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>

Calvar, N. E. (2013). Estudio de genes involucrados en procesos de muerte celular apoptótica y desarrollo larvario en mejillón:(*mytilus galloprovincialis*) (Doctoral dissertation, Universidade de Vigo).

Casu, A., Camardo Leggieri, M., Toscano, P., & Battilani, P. (2024). Changing climate, shifting mycotoxins: A comprehensive review of climate change impact on mycotoxin contamination. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(2). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13323>

Çelik, M. Y., Karayücel, S., Karayücel, İ., Öztürk, R., & Eyüboğlu, B. (2012). Meat yield, condition index, and biochemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) in sinop, south of the black sea. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21(3), 198-205. <https://doi.org/10.1080/10498850.2011.589099>

Chance, R. J., Cameron, G. A., Fordyce, M., Noguera, P., Wang, T., Collins, C., Secombes, C. J., & Collet, B. (2018). Effects of repeated anaesthesia on gill and general health of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, 93(6), 1069-1081. <https://doi.org/10.1111/jfb.13803>

Chen S. N. (1991). Environmental problems of aquaculture in Asia and their solutions. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 10(3), 609–627. <https://doi.org/10.20506/rst.10.3.576>

Chen, W., & Gao, S. (2023). Current status of industrialized aquaculture in China: a review. *Environmental Science and Pollution Research International*, 30(12), 32278-32287. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25601-9>

Chen, W., Gao, S. Current status of industrialized aquaculture in China: a review. *Environ Sci Pollut Res* 30, 32278–32287 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25601-9>

Chislock, M. F., Doster, E., Zitomer, R. A., & Wilson, A. E. (2013). Eutrophication: causes, consequences, and controls in aquatic ecosystems. *Nature Education Knowledge*, 4(4), 10.

Cipriano, R. C., & Bullock, G. L. (2001). Furunculosis and other diseases caused by *Aeromonas salmonicida*. National Fish Health Research Laboratory.

Clavelle, T., Lester, S. E., Gentry, R., & Froehlich, H. E. (2019). Interactions and management for the future of marine aquaculture and capture fisheries. *Fish and Fisheries* (Oxford, England), 20(2), 368-388. <https://doi.org/10.1111/faf.12351>

Coppola, D., Lauritano, C., Palma Esposito, F., Riccio, G., Rizzo, C., & de Pascale, D. (2021). Fish waste: From problem to valuable resource. *Marine Drugs*, 19(2), 116. <https://doi.org/10.3390/md19020116>

Corum, O., Durna Corum, D., Terzi, E., & Uney, K. (2023). Pharmacokinetics, tissue residues, and withdrawal times of oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after single- and multiple-dose oral administration. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 13(24), 3845. <https://doi.org/10.3390/ani13243845>

Costa-Pierce, B. A. (2022). The anthropology of aquaculture. *Frontiers in sustainable food systems*, 6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.843743>

Costa, M. M., Dios, S., Alonso-Gutierrez, J., Romero, A., Novoa, B., & Figueras, A. (2009). Evidence of high individual diversity on myticin C in mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Developmental and Comparative Immunology*, 33(2), 162-170. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.08.005>

de Bruijn, I., Liu, Y., Wiegertjes, G. F., & Raaijmakers, J. M. (2018). Exploring fish microbial communities to mitigate emerging diseases in aquaculture. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(1), fix161. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix161>

Defoirdt, T., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 251-258. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.004>

Deng, Y., Xu, L., Chen, H., Liu, S., Guo, Z., Cheng, C., Ma, H., & Feng, J. (2020). Prevalence, virulence genes, and antimicrobial resistance of *Vibrio* species isolated from diseased marine fish in South China. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71288-0>

Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Carnevali, O., Picchietti, S., Avella, M., Daniels, C., Güroy, D., & Davies, S. J. (2011). Microbial manipulations to improve fish health and production – A Mediterranean perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.08.009>

Donati, V. L., Dalsgaard, I., Sundell, K., Castillo, D., Er-Rafik, M., Clark, J., Wiklund, T., Middelboe, M., & Madsen, L. (2021). Phage-Mediated Control of *Flavobacterium psychrophilum* in Aquaculture: In vivo Experiments to Compare Delivery Methods. *Frontiers in Microbiology*, 12, 628309. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628309>

Donato, P., Micalizzi, G., Oteri, M., Rigano, F., Sciarrone, D., Dugo, P., & Mondello, L. (2018). Comprehensive lipid profiling in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) using hyphenated and multidimensional chromatography techniques coupled to mass spectrometry detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(14), 3297-3313. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1045-3>

Dong, H., Chen, Y., Wang, J., Zhang, Y., Zhang, P., Li, X., Zou, J., & Zhou, A. (2021). Interactions of microplastics and antibiotic resistance genes and their effects on the aquaculture environments. *Journal of Hazardous Materials*, 403(123961), 123961. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123961>

Elema, M. O., Hoff, K. A., & Kristensen, H. G. (1996). Bioavailability of oxytetracycline from medicated feed administered to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater. *Aquaculture*, 143(1), 7-14.

Facklam, R., Elliott, J., Shewmaker, L., & Reingold, A. (2005). Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae* isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 933-937. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.2.933-937.2005>

FAO. 2022. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>

Ferguson-Cradler, G. (2021). The overfishing problem: Natural and social categories in early twentieth-century fisheries science. *Journal of the History of Biology*, 54(4), 719-738. <https://doi.org/10.1007/s10739-021-09655-4>

Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., & dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>

Fortt Z, A., Cabello C, F., & Buschmann R, A. (2007). Residuos de tetraciclina y quinolonas en peces silvestres en una zona costera donde se desarrolla la acuicultura del salmón en Chile. *Revista Chilena de Infectología: Organó Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 24(1), 14-18. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182007000100002>

Frère, L., Maignien, L., Chalopin, M., Huvet, A., Rinnert, E., Morrison, H., Kerninon, S., Cassone, A.-L., Lambert, C., Reveillaud, J., & Paul-Pont, I. (2018). Microplastic bacterial communities in the Bay of Brest: Influence of polymer type and size. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 242, 614-625. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.023>

García-Rosado, E., Cano, I., Martín-Antonio, B., Labella, A., Manchado, M., Alonso, M. C., ... & Borrego, J. J. (2007). Co-occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured sparid fish. *International Microbiology*, 10(3), 193.

Gentry, R. R., Lester, S. E., Kappel, C. V., White, C., Bell, T. W., Stevens, J., & Gaines, S. D. (2017). Offshore aquaculture: Spatial planning principles for sustainable development. *Ecology and Evolution*, 7(2), 733-743. <https://doi.org/10.1002/ece3.2637>

Gerdol, M., De Moro, G., Manfrin, C., Venier, P., & Pallavicini, A. (2012). Big defensins and mytimacins, new AMP families of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 36(2), 390-399. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.08.003>

Gjedrem, T. (2012). Genetic improvement for the development of efficient global aquaculture: A personal opinion review. *Aquaculture* (Amsterdam, Netherlands), 344-349, 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.003>

González-Gaya, B., García-Bueno, N., Buelow, E., Marin, A., & Rico, A. (2022). Effects of aquaculture waste feeds and antibiotics on marine benthic ecosystems in the Mediterranean Sea. *The Science of the Total Environment*, 806(151190), 151190. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151190>

Guijarro, J. A., Cascales, D., García-Torrico, A. I., García-Domínguez, M., & Méndez, J. (2015). Temperature-dependent expression of virulence genes in fish-pathogenic bacteria. *Frontiers in microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00700>

Haesemeyer, M. (2020). Thermoregulation in fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518(110986), 110986. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110986>

Halpern, B. S., Frazier, M., Potapenko, J., Casey, K. S., Koenig, K., Longo, C., Lowndes, J. S., Rockwood, R. C., Selig, E. R., Selkoe, K. A., & Walbridge, S. (2015). Spatial and temporal changes in cumulative human impacts on the world's ocean. *Nature Communications*, 6(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/ncomms8615>

Halpern, B. S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C. V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J. F., Casey, K. S., Ebert, C., Fox, H. E., Fujita, R., Heinemann, D., Lenihan, H. S., Madin, E. M. P., Perry, M. T., Selig, E. R., Spalding, M., Steneck, R., & Watson, R. (2008). A global map of human impact on marine ecosystems. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5865), 948-952. <https://doi.org/10.1126/science.1149345>

Hargrave, B. T. (2010). Empirical relationships describing benthic impacts of salmon aquaculture. *Aquaculture Environment Interactions*, 1(1), 33-46. <https://doi.org/10.3354/aei00005>

Hashish, E., Merwad, A., Elgaml, S., Amer, A., Kamal, H., Elsadek, A., Marei, A., & Sito, M. (2018). *Mycobacterium marinum* infection in fish and man: epidemiology, pathophysiology and management; a review. *The Veterinary Quarterly*, 38(1), 35-46. <https://doi.org/10.1080/01652176.2018.1447171>

He, Q., & Silliman, B. R. (2019). Climate change, human impacts, and coastal ecosystems in the anthropocene. *Current Biology: CB*, 29(19), R1021-R1035. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.042>

Helsens, N., Calvez, S., Prevost, H., Bouju-Albert, A., Maillet, A., Rossero, A., Hurtaud-Pessel, D., Zagorec, M., & Magras, C. (2020). Antibiotic resistance genes and bacterial communities of farmed rainbow trout fillets (*Oncorhynchus mykiss*). *Frontiers in microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.590902>

Hobday, A., CSIRO, Oliver, E., Sen Gupta, A., Benthuyssen, J., Burrows, M., Donat, M., Holbrook, N., Moore, P., Thomsen, M., Wernberg, T., & Smale, D. (2018). Categorizing and naming marine heatwaves. *Oceanography* (Washington, D.C.), 31(2). <https://doi.org/10.5670/oceanog.2018.205>

Holmer, M., Duarte, C. M., Heilskov, A., Olesen, B., & Terrados, J. (2003). Biogeochemical conditions in sediments enriched by organic matter from net-pen fish farms in the Bolinao area, Philippines. *Marine Pollution Bulletin*, 46(11), 1470-1479. [https://doi.org/10.1016/s0025-326x\(03\)00281-9](https://doi.org/10.1016/s0025-326x(03)00281-9)

Kashulin, A., Sereckina, N., & Sørum, H. (2017). Cold-water vibriosis. The current status of knowledge. *Journal of Fish Diseases*, 40(1), 119-126. <https://doi.org/10.1111/jfd.12465>

Kirstein, I. V., Kirmizi, S., Wichels, A., Garin-Fernandez, A., Eler, R., Löder, M., & Gerdtts, G. (2016). Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic *Vibrio* spp. on microplastic particles. *Marine Environmental Research*, 120, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.07.004>

Klinger, D. H., Levin, S. A., & Watson, J. R. (2017). The growth of finfish in global open-ocean aquaculture under climate change. *Proceedings. Biological Sciences*, 284(1864), 20170834. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0834>

Klohmann, C. A., & Padilla-Gamiño, J. L. (2022). Pathogen filtration: An untapped ecosystem service. *Frontiers in marine science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.921451>

Krkošek, M. (2017). Population biology of infectious diseases shared by wild and farmed fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 74(4), 620-628. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2016-0379>

Lafferty, K. D., Harvell, C. D., Conrad, J. M., Friedman, C. S., Kent, M. L., Kuris, A. M., Powell, E. N., Rondeau, D., & Saksida, S. M. (2015). Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Annual Review of Marine Science*, 7(1), 471-496. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646>

Lara Flores, M., 2010. Importancia de la diversidad y ecología marina microbiana en los ecosistemas marinos costeros, p. 277-288. En: E. Rivera-Arriaga, I. Azuz-Adeath, L. Alpuche Gual y G.J. Vi- Ilalobos-Zapata (eds.). *Cambio Climático en México un Enfoque Costero-Marino*. Universidad Autónoma de Campeche Cety- Universidad, Gobierno del Estado de Campeche. 944 p.

- Lassen, S. B., Ahsan, M. E., Islam, S. R., Zhou, X.-Y., Razzak, M. A., Su, J.-Q., & Brandt, K. K. (2022). Prevalence of antibiotic resistance genes in Pangasianodon hypophthalmus and Oreochromis niloticus aquaculture production systems in Bangladesh. *The Science of the Total Environment*, 813(151915), 151915. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151915>
- Leal, J. F., Santos, E. B. H., & Esteves, V. I. (2019). Oxytetracycline in intensive aquaculture: water quality during and after its administration, environmental fate, toxicity and bacterial resistance. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1176-1194. <https://doi.org/10.1111/raq.12286>
- Leung, K. Y., Wang, Q., Yang, Z., & Siame, B. A. (2019). *Edwardsiella piscicida*: A versatile emerging pathogen of fish. *Virulence*, 10(1), 555-567. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1621648>
- Leung, K. Y., Wang, Q., Zheng, X., Zhuang, M., Yang, Z., Shao, S., Achmon, Y., & Siame, B. A. (2022). Versatile lifestyles of *Edwardsiella*: Free-living, pathogen, and core bacterium of the aquatic resistome. *Virulence*, 13(1), 5-18. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2006890>
- Li, C., Chen, H.-Q., Gao, P., Huang, X.-H., Zhu, Y.-X., Xu, M., Yuan, Q., Gao, Y., & Shen, X.-X. (2023). Distribution and drivers of antibiotic resistance genes in brackish water aquaculture sediment. *The Science of the Total Environment*, 860(160475), 160475. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160475>
- Li, Chengwei, Wang, S., Ren, Q., He, T., & Chen, X. (2020). An outbreak of visceral white nodules disease caused by *Pseudomonas plecoglossicida* at a water temperature of 12°C in cultured large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in China. *Journal of Fish Diseases*, 43(11), 1353-1361. <https://doi.org/10.1111/jfd.13206>
- Li, S., Yang, Z., Nadolnyak, D., Zhang, Y., & Luo, Y. (2016). Economic impacts of climate change: profitability of freshwater aquaculture in China. *Aquaculture Research*, 47(5), 1537-1548. <https://doi.org/10.1111/are.12614>
- Li, Shuang, Tang, X., Lu, Y., Xu, J., Chen, J., & Chen, H. (2021). An improved method for the separation of carotenoids and carotenoid isomers by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 44(2), 539-548. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000902>
- Liao, I. C., & Chao, N. H. (2009). Aquaculture and food crisis: opportunities and constraints. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 18(4), 564–569.
- Lima Junior, D. P., Magalhães, A. L. B., Pelicice, F. M., Vitule, J. R. S., Azevedo-Santos, V. M., Orsi, M. L., Simberloff, D., & Agostinho, A. A. (2018). Aquaculture expansion in Brazilian freshwaters against the Aichi Biodiversity Targets. *Ambio*. <https://doi.org/10.1007/s13280-017-1001-z>

Liu, X., Wang, H., & Zhao, H. (2020). Propagation of antibiotic resistance genes in an industrial recirculating aquaculture system located at northern China. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 261(114155), 114155. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114155>

Llorente García, I. (2013). Análisis de competitividad de las empresas de acuicultura. Aplicaciones empíricas al cultivo de la dorada (*Sparus aurata*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*).

Lucas, J. (2015). Aquaculture. *Curr Biol*, 25(22), R1064-1065. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.013>

Lv, J., Zhao, J., Yang, D., Wu, H., & Cong, M. (2019). Tissue distribution and functional characterization of mytimacin-4 in *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 166(107215), 107215. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107215>

Ma, R., Yang, Y., Cao, H., & Li, P. (2023). Editorial: Aquaculture animal diseases: pathogens and control. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1223046>

MacPherson, D. W. (2009). Population mobility, globalization, and antimicrobial drug resistance. *Emerging infectious diseases*, 15(11), 1727. <https://doi.org/10.3201/eid1511.090419>

Maoka, T., Etoh, T., Borodina, A. V., & Soldatov, A. A. (2011). A series of 19'-hexanoyloxyfucoxanthin derivatives from the sea mussel, *Mytilus galloprovincialis*, grown in the black sea, Ukraine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 13059-13064. <https://doi.org/10.1021/jf2035115>

Martinez-Porchas, M., & Martinez-Cordova, L. R. (2012). World aquaculture: Environmental impacts and troubleshooting alternatives. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 1-9. <https://doi.org/10.1100/2012/389623>

Miller, R. A., & Harbottle, H. (2018). Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. *Microbiology Spectrum*, 6(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0017-2017>

Miranda, C. D., Godoy, F. A., & Lee, M. R. (2018). Current status of the use of antibiotics and the antimicrobial resistance in the Chilean salmon farms. *Frontiers in microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01284>

Mitta, G. (2000). Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Developmental and comparative immunology*, 24(4), 381-393. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(99\)00084-1](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(99)00084-1)

Mitta, Guillaume, Vandenbulcke, F., Hubert, F., & Roch, P. (1999). Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *Journal of Cell Science*, 112(23), 4233-4242. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.23.4233>

Mo, W. Y., Man, Y. B., & Wong, M. H. (2018). Use of food waste, fish waste and food processing waste for China's aquaculture industry: Needs and challenge. *The Science of the Total Environment*, 613-614, 635-643. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.321>

Mohamad, N., Amal, M. N. A., Yasin, I. S. M., Zamri Saad, M., Nasruddin, N. S., Al-saari, N., Mino, S., & Sawabe, T. (2019). Vibriosis in cultured marine fishes: a review. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 512(734289), 734289. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734289>

Mugwanya, M., Dawood, M. A. O., Kimera, F., & Sewilam, H. (2022a). Anthropogenic temperature fluctuations and their effect on aquaculture: A comprehensive review. *Aquaculture and Fisheries*, 7(3), 223-243. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.12.005>

Mugwanya, M., Dawood, M. A. O., Kimera, F., & Sewilam, H. (2022b). Updating the role of probiotics, prebiotics, and synbiotics for Tilapia aquaculture as leading candidates for food sustainability: A review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(1), 130-157. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09852-x>

Nag, M., Lahiri, D., Dey, A., Sarkar, T., Pati, S., Joshi, S., Bunawan, H., Mohammed, A., Edinur, H. A., Ghosh, S., & Ray, R. R. (2022). Seafood discards: A potent source of enzymes and biomacromolecules with nutritional and nutraceutical significance. *Frontiers in nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.879929>

Naylor, R. L., Hardy, R. W., Buschmann, A. H., Bush, S. R., Cao, L., Klinger, D. H., Little, D. C., Lubchenco, J., Shumway, S. E., & Troell, M. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, 591(7851), 551-563. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6>

Nematollahi, A., Decostere, A., Pasmans, F., & Haesebrouck, F. (2003). *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 26(10), 563-574. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00488.x>

Norman, R. A., Crumlish, M., & Stetkiewicz, S. (2019). The importance of fisheries and aquaculture production for nutrition and food security: -EN- -FR- L'importance de la production halieutique et aquacole pour la sécurité nutritionnelle et alimentaire -ES- Importancia de la pesca y la producción acuícola para la seguridad nutricional y alimentaria. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 38(2), 395-407. <https://doi.org/10.20506/rst.38.2.2994>

Nyaa, L. B. T., Tapondjou, L., Barboni, L., Tamokou, J., Kuitaté, J., Tane, P., & Park, H.-J. (2009). NMR Assignment and Antimicrobial/Antioxidant Activities of 1 β -Hydroxyeuscaphic acid from the Seeds of *Butyrospermum parkii*. *Natural Product Sciences*. <https://www.semanticscholar.org/paper/dcc7c9b29060fae887c5dd2e05b3372e05f12a6a>

Oh, R., Lee, M. J., Kim, Y.-O., Nam, B.-H., Kong, H. J., Kim, J.-W., Park, J. Y., Seo, J.-K., & Kim, D.-G. (2018). Purification and characterization of an antimicrobial peptide mytichitin-chitin binding domain from the hard-

shelled mussel, *Mytilus coruscus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 83, 425-435.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.009>

Oliva-Teles, A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*, 35(2), 83-108.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x>

Pacor, S., Benincasa, M., Musso, M. V., Krce, L., Aviani, I., Pallavicini, A., Scocchi, M., Gerdol, M., & Mardirossian, M. (2021). The proline-rich myticalins from *Mytilus galloprovincialis* display a membrane-permeabilizing antimicrobial mode of action. *Peptides*, 143(170594), 170594. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170594>

Pallavicini, A., del Mar Costa, M., Gestal, C., Dreos, R., Figueras, A., Venier, P., & Novoa, B. (2008). High sequence variability of myticin transcripts in hemocytes of immune-stimulated mussels suggests ancient host–pathogen interactions. *Developmental and Comparative Immunology*, 32(3), 213-226.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.05.008>

Pope, K. L., Pegg, M. A., Cole, N. W., Siddons, S. F., Fedele, A. D., Harmon, B. S., Ruskamp, R. L., Turner, D. R., & Uerling, C. C. (2016). Fishing for ecosystem services. *Journal of Environmental Management*, 183, 408-417.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.04.024>

Quimpo, T. J. R., Ligson, C. A., Manogan, D. P., Requilme, J. N. C., Albelda, R. L., Conaco, C., & Cabaitan, P. C. (2020). Fish farm effluents alter reef benthic assemblages and reduce coral settlement. *Marine Pollution Bulletin*, 153(111025), 111025. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111025>

Regev, Y., Davidovich, N., Berzak, R., Lau, S. C. K., Scheinin, A. P., Tchernov, D., & Morick, D. (2020). Molecular identification and characterization of *Vibrio* species and *Mycobacterium* species in wild and cultured marine fish from the Eastern Mediterranean Sea. *Microorganisms*, 8(6), 863.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8060863>

Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D., Avarre, J.-C., Combe, M., Pepey, E., Pouyau, L., Vega-Heredía, S., de Verdal, H., & Gozlan, R. E. (2020). Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. *Nature Communications*, 11(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15735-6>

Rigos, G., Tyrpenou, Nengas, I., Alexis, A. E. M., Athanassopoulou, F., & Troisi, G. M. (2004). Poor bioavailability of oxytetracycline in sharpsnout sea bream *Diplodus puntazzo*. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 235(1-4), 489-497. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.016>

Roques, S., Deborde, C., Richard, N., Skiba-Cassy, S., Moing, A., & Fauconneau, B. (2020). Metabolomics and fish nutrition: a review in the context of sustainable feed development. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 261-282.
<https://doi.org/10.1111/raq.12316>

Rosani, U., Varotto, L., Rossi, A., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A., Pallavicini, A., & Venier, P. (2011). Massively parallel amplicon sequencing reveals isotype-specific variability of antimicrobial peptide transcripts in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One*, 6(11), e26680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026680>

Ruiz-Torres, V., Rodríguez-Pérez, C., Herranz-López, M., Martín-García, B., Gómez-Caravaca, A.-M., Arráz-Román, D., Segura-Carretero, A., Barrajón-Catalán, E., & Micol, V. (2019). Marine invertebrate extracts induce colon cancer cell death via ROS-mediated DNA oxidative damage and mitochondrial impairment. *Biomolecules*, 9(12), 771. <https://doi.org/10.3390/biom9120771>

Salas, R. G., del Río, M. M. V., & Concepción, I. P. (2021). Uso intensivo de antibióticos profilácticos en la acuicultura: un problema creciente para la salud humana y animal. *Universidad y Sociedad*, 13(S2), 204-210. <https://rus.ucf.edu.cu/index.php/rus/article/view/2304>

Salgueiro, H. S., Ferreira, A. C., Duarte, A. S. R., & Botelho, A. (2024). Source attribution of antibiotic resistance genes in estuarine aquaculture: A machine learning approach. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 13(1), 107. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010107>

Sanmartín, R. M. (2015). Advances in bivalve molluscs immune system (Doctoral dissertation, Universidade de Vigo)

Santos, L., & Ramos, F. (2018). Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(2), 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010>

Schar, D., Klein, E. Y., Laxminarayan, R., Gilbert, M., & Van Boeckel, T. P. (2020). Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78849-3>

Scharsack, J. P., & Franke, F. (2022). Temperature effects on teleost immunity in the light of climate change. *Journal of Fish Biology*, 101(4), 780-796. <https://doi.org/10.1111/jfb.15163>

Seyfried, E. E., Newton, R. J., Rubert, K. F., IV, Pedersen, J. A., & McMahon, K. D. (2010). Occurrence of tetracycline resistance genes in aquaculture facilities with varying use of oxytetracycline. *Microbial Ecology*, 59(4), 799-807. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9624-7>

Shen, Y., Zhang, R., Schwarz, S., Wu, C., Shen, J., Walsh, T. R., & Wang, Y. (2020). Farm animals and aquaculture: significant reservoirs of mobile colistin resistance genes. *Environmental Microbiology*, 22(7), 2469-2484. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14961>

Sicuro, B. (2021). World aquaculture diversity: origins and perspectives. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1619-1634. <https://doi.org/10.1111/raq.12537>

- Sidhu, P. K., Smith, S. A., Mayer, C., Magnin, G., Kuhn, D. D., Jaber-Douraki, M., & Coetzee, J. F. (2018). Comparative pharmacokinetics of oxytetracycline in tilapia (*Oreochromis spp.*) maintained at three different salinities. *Aquaculture* (Amsterdam, Netherlands), 495, 675-681. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.044>
- Silva, M. M., Maldonado, G. C., Castro, R. O., de Sá Felizardo, J., Cardoso, R. P., Anjos, R. M. dos, & Araújo, F. V. de. (2019). Dispersal of potentially pathogenic bacteria by plastic debris in Guanabara Bay, RJ, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 141, 561-568. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.064>
- Sinha, S., Das, S., Saha, B., Paul, D., & Basu, B. (2023). Anti-microbial, anti-oxidant, and anti-breast cancer properties unraveled in yeast carotenoids produced via cost-effective fermentation technique utilizing waste hydrolysate. *Frontiers in microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1088477>
- Smith, K. E., Burrows, M. T., Hobday, A. J., Sen Gupta, A., Moore, P. J., Thomsen, M., Wernberg, T., & Smale, D. A. (2021). Socioeconomic impacts of marine heatwaves: Global issues and opportunities. *Science* (New York, N.Y.), 374(6566), eabj3593. <https://doi.org/10.1126/science.abj3593>
- Soliman, W. S., Shaapan, R. M., Mohamed, L. A., & Gayed, S. S. R. (2019). Recent biocontrol measures for fish bacterial diseases, in particular to probiotics, bio-encapsulated vaccines, and phage therapy. *Open Veterinary Journal*, 9(3), 190. <https://doi.org/10.4314/ovj.v9i3.2>
- Srinivasan, U. T., Cheung, W. W. L., Watson, R., & Sumaila, U. R. (2010). Food security implications of global marine catch losses due to overfishing. *Journal of Bioeconomics*, 12(3), 183-200. <https://doi.org/10.1007/s10818-010-9090-9>
- Stenger, K. S., Wikmark, O. G., Bezuidenhout, C. C., & Molale-Tom, L. G. (2021). Microplastics pollution in the ocean: Potential carrier of resistant bacteria and resistance genes. *Environmental Pollution* (Barking, Essex: 1987), 291(118130), 118130. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118130>
- Subasinghe, R., Soto, D., & Jia, J. (2009). Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 2-9. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01002.x>
- Sumaila, U. R. (2022). Overfishing, climate change, and the chance of achieving Infinity Fish. En *Infinity Fish* (pp. 213-224). Elsevier.
- Suyamud, B., Lohwacharin, J., Yang, Y., & Sharma, V. K. (2021). Antibiotic resistant bacteria and genes in shrimp aquaculture water: Identification and removal by ferrate(VI). *Journal of Hazardous Materials*, 420(126572), 126572. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126572>

- Tamminen, M., Karkman, A., Löhmus, A., Muziasari, W. I., Takasu, H., Wada, S., Suzuki, S., & Virta, M. (2011). Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure. *Environmental Science & Technology*, 45(2), 386-391. <https://doi.org/10.1021/es102725n>
- Tincu, J. A., & Taylor, S. W. (2004). Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3645-3654. <https://doi.org/10.1128/aac.48.10.3645-3654.2004>
- Tomova, A., Ivanova, L., Buschmann, A. H., Rioseco, M. L., Kalsi, R. K., Godfrey, H. P., & Cabello, F. C. (2015). Antimicrobial resistance genes in marine bacteria and human uropathogenic *Escherichia coli* from a region of intensive aquaculture. *Environmental Microbiology Reports*, 7(5), 803-809. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12327>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5649-5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- van Haaften, R. I. M., Evelo, C. T. A., Haenen, G. R. M. M., & Bast, A. (2001). No reduction of α -tocopherol quinone by glutathione in rat liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*, 61(6), 715-719. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(01\)00545-7](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(01)00545-7)
- van Sebille, E., Wilcox, C., Lebreton, L., Maximenko, N., Hardesty, B. D., van Franeker, J. A., Eriksen, M., Siegel, D., Galgani, F., & Law, K. L. (2015). A global inventory of small floating plastic debris. *Environmental research letters*, 10(12), 124006. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/10/12/124006>
- Venier, P., Varotto, L., Rosani, U., Millino, C., Celegato, B., Bernante, F., Lanfranchi, G., Novoa, B., Roch, P., Figueras, A., & Pallavicini, A. (2011). Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-69>
- Vershinin, A. (1996). Carotenoids in mollusca: approaching the functions. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 113(1), 63-71. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(96\)00104-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(96)00104-6)
- Vignesh, R., Karthikeyan, B. S., Periyasamy, N., & Devanathan, K. (2011). Antibiotics in aquaculture: an overview. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 1(3), 114-120.
- Walters, B. B., Rönnbäck, P., Kovacs, J. M., Crona, B., Hussain, S. A., Badola, R., Primavera, J. H., Barbier, E., & Dahdouh-Guebas, F. (2008). Ethnobiology, socio-economics and management of mangrove forests: A review. *Aquatic Botany*, 89(2), 220-236. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.02.009>

Wang, G., Xie, J., Yin, G., Yu, D., Yu, E., Wang, H., & Gong, W. (2010). Influences of aquiculture on ecological environment. *International Journal of Biology*, 2(2), 158.

Wiklund, T., & Dalsgaard, I. (1998). Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. *Diseases of Aquatic Organisms*, 32, 49-69. <https://doi.org/10.3354/dao032049>

Yan, H. F., Kyne, P. M., Jabado, R. W., Leeney, R. H., Davidson, L. N. K., Derrick, D. H., Finucci, B., Freckleton, R. P., Fordham, S. V., & Dulvy, N. K. (2021). Overfishing and habitat loss drive range contraction of iconic marine fishes to near extinction. *Science Advances*, 7(7). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb6026>

Yang, H., School of Computer Science and Technology, Shandong Technology and Business University, Yantai, China, Liu, S., Co-innovation Center of Shandong Colleges and Universities: Future Intelligent Computing, Shandong Technology and Business University, Yantai, China, & Binzhou Medical University, Yantai, China. (2021). A prediction model of aquaculture water quality based on multiscale decomposition. *Mathematical biosciences and engineering: MBE*, 18(6), 7561-7579. <https://doi.org/10.3934/mbe.2021374>

Zeng, J., Yang, Z., Zhong, Y., Zheng, Y., Hao, J., Luo, G., & Yan, Q. (2022). Metabolomics insights into the interaction between *Pseudomonas plecoglossicida* and *Epinephelus coioides*. *Scientific Reports*, 12(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17387-6>

Zhang, J., Akyol, Ç., & Meers, E. (2023). Nutrient recovery and recycling from fishery waste and by-products. *Journal of Environmental Management*, 348(119266), 119266. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119266>

Zhang, X., Zhang, Y., Zhang, Q., Liu, P., Guo, R., Jin, S., Liu, J., Chen, L., Ma, Z., & Liu, Y. (2020). Evaluation and analysis of water quality of marine aquaculture area. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4), 1446. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041446>

Zhou, M., Yu, S., Hong, B., Li, J., Han, H., & Qie, G. (2021). Antibiotics control in aquaculture requires more than antibiotic-free feeds: A tilapia farming case. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 268(115854), 115854. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115854>

Ziarati, M., Zorriehzakra, M. J., Hassantabar, F., Mehrabi, Z., Dhawan, M., Sharun, K., Emran, T. B., Dhama, K., Chaicumpa, W., & Shamsi, S. (2022). Zoonotic diseases of fish and their prevention and control. *The Veterinary Quarterly*, 42(1), 95-118. <https://doi.org/10.1080/01652176.2022.2080298>