







Université du Québec  
à Rimouski

**Optimisation de l'aquaculture multitrophique par l'intégration  
de la macroalgue *Ulva lactuca* dans la moulée du poisson marin  
Pompano de Floride (*Trachinotus carolinus*)**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en océanographie

en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences

PAR

© FLAVIE PERRON

Mai 2024



**Composition du jury :**

**Céline Audet, présidente du jury, Université du Québec à Rimouski**

**Réjean Tremblay, directeur de recherche, Université du Québec à Rimouski**

**Sahar Mejri, codirectrice de recherche, Florida Atlantic University**

**Grant Vandenberg, examinateur externe, Université Laval**

Dépôt initial le 11 janvier 2024

Dépôt final le 27 mai 2024

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI  
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.



Pour mes parents, qui m'ont  
toujours encouragée à poursuivre mes  
études.







## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude envers Réjean Tremblay, mon directeur de recherche, pour son écoute et sa jovialité contagieuse, mais avant tout, pour sa patience des derniers mois. C'est en grande partie grâce à Réjean que j'ai été introduite à Sahar Mejri qui m'a offert l'opportunité de réaliser ce projet de maîtrise en Floride. Bien que cette idée fût initialement intimidante, je suis convaincue qu'elle s'est révélée être une expérience de vie formidable. De ce fait, je remercie Sahar, ma codirectrice, de m'avoir accueillie dans son laboratoire au Harbor Branch Oceanographic Institute (HBOI) du Florida Atlantic University (FAU) à Fort Pierce, et de m'avoir offert son soutien indéniab. Sa bienveillance, son expertise et son dévouement ont enrichi mon expérience de recherche, et j'en suis reconnaissante.

Je tiens à remercier Mitacs Globalink, la Fondation de l'UQAR, l'USDA (U.S. Department of Agriculture), le Link Foundation et Ressources Aquatiques Québec (RAQ) pour leur généreux soutien financier qui a rendu possible la réalisation de ce projet de recherche.

I want to extend my heartfelt appreciation to all the members of the lab, Ben, Alyson, Magaleate, Joedeelee, and Kiedon for their invaluable assistance in helping me manage the demanding workload in the lab, I couldn't have done it without you guys. I extend my thanks to Paul S. Wills as well as Marty Riche for their invaluable inputs to various aspects of my project. A special thanks to the whole team at ACTED who took care of the fish and made this experiment possible, the aquaculture facilities managers (Christopher Robinson and Richard Baptiste), and the aquaculture technician team (Jenna Baggett, Madison Wheeler, Alex Dodge, Ryan Winant, Erica Slaten, Zachary Niles, and Richard Mulroy). Your knowledge and experience were immensely valuable to me, and I am grateful for your contribution and involvement in this project. Thank you all sincerely for your dedication and hard work. You guys are the best.

I'd like to thank my friends in Florida for making it feel like home: Abby, Ipanema, Ocean, Noah, and Katie. The trips to the beach, learning how to surf, the baking and movie

nights helped me get through the year as I was missing the Quebec winter (weird as it sounds). I will be forever grateful to have made such memorable friends who brought so much joy in my year in the Sunshine State. Abby and Noah, thank you for giving me a second home (you kind of didn't have a choice) where I felt cherished and welcomed. Ipanema, your boundless energy brought an exhilarating chaos (in the best possible way) into my life. Ocean and Katie, thank you for fostering such a lively atmosphere where I always felt at ease and free to be myself. All of you guys' laughter, support, and shared moments left an indelible mark on my heart and made this experience memorable for me. I'll never forget it.

Puis, je remercie mes amies de Rimouski, Mariame (Mimo) pour l'aide en statistiques sur PRIMER, Chloé pour ses crêpes bretonnes divines et son rire contagieux, et Margaux pour les soirées films partagées ensemble en colocation, nos appels à distance et j'en oublie. J'aimerais surtout remercier Marie-Anne, une amie de longue date, pour son aide autant pour Photoshop que pour R Studio (avant que j'abandonne l'utilisation de ce programme) alors que j'étais en panique de fin de maîtrise. Nos soirées et week-ends passés ensemble, à siroter du Maté et à partager nos détresses académiques, ont été un réconfort pour moi alors que je terminais mon mémoire avant les fêtes. Ces souvenirs sont des montagnes russes émotionnelles, mais je vais les garder en mémoire avec un mélange de nostalgie et de gratitude. Merci d'avoir été là.

Finalement, un dernier p'tit mot pour Réjean : Pompano-yes, me semble ça sonne mieux.



## RÉSUMÉ

La farine de poisson, couramment utilisée dans les moulées commerciales de poissons carnivores, est coûteuse en plus d'être de disponibilité variable et limitée. Son remplacement partiel par une protéine algale permettrait de réduire les coûts associés à la production piscicole et d'améliorer la durabilité de l'industrie. L'objectif était de comparer des régimes généralement utilisés en pisciculture avec un régime expérimental dont 10 % de la farine de poisson fut substituée par la macroalgue *Ulva lactuca*, provenant d'un système AMTI (Aquaculture Multitrophique Intégrée), et d'étudier l'impact sur la performance reproductive et sur la qualité de la progéniture des géniteurs Pompano de Floride (*Trachinotus carolinus*). Les différentes alimentations ont été chacune testées 8 semaines, successivement, sur le même groupe de 40 géniteurs, débutant par l'alimentation contrôle (composée de crevettes et krill), suivie de la moulée Breed-M et finalement la moulée comprenant *Ulva*. Des suites de chaque ponte, la composition en acides gras et les caractéristiques générales des œufs et des larves, telles que (1) le nombre d'œufs par ml, (2) le diamètre des œufs et de (3) leur gouttelette d'huile, (4) le taux de fécondation et (5) d'éclosion puis (6) la longueur des larves nouvellement écloses et (7) de leur sac vitellin et (8) gouttelette d'huile, ont été mesurés. Le taux d'éclosion et le diamètre de l'œuf étaient plus importants pour les femelles nourries au régime *Ulva* tandis que la gouttelette d'huile était de taille supérieure pour le traitement contrôle. La progéniture obtenue de femelles nourries à la moulée *Ulva* comprenait davantage d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne (LC-PUFA), spécifiquement en acide docosahexaénoïque (C22 :6n3 ; DHA), avec le ratio DHA/EPA et le contenu en acides gras constamment supérieurs aux autres régimes. Les résultats suggèrent que la progéniture obtenue par les femelles nourries avec la moulée *Ulva* serait de qualité similaire, voire supérieure, aux autres alimentations. La macroalgue *U. lactuca* pourrait être remplacer jusqu'à 10 % de la farine de poisson dans les moulées aquacoles du Pompano de Floride avec des effets prometteurs sur la performance reproductive, tout en réduisant les coûts de production et faire usage de sous-produits d'un système AMTI.

Mots clés : *Trachinotus carolinus*, remplacement partiel, farine de poisson, *Ulva lactuca*, qualité d'œufs, performance larvaire, acides gras essentiels, AMTI



## ABSTRACT

Fishmeal is commonly used in commercial feeds of carnivorous fish and is an expensive ingredient with variable nutritional composition and limited availability. Its partial replacement by an algal protein would reduce the costs associated with fish production and improve the industry's sustainability. The objective of this project was to compare commonly used broodstock feeds with an experimental diet in which 10 % of the fishmeal was substituted with the macroalgae *Ulva lactuca*, from an Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) system, on the reproductive performance and quality of the offspring of Florida pompano broodstock (*Trachinotus carolinus*). The different feeds were each tested for 8 weeks, successively, on the same group of 40 broodstock, starting with the control diet (shrimp and krill), followed by a commercial gel diet (Breed-M), and finally a pelleted feed with 10% *Ulva* replacement. After each spawning event, the fatty acid composition and the eggs, and larvae metrics such as (1) eggs per ml, (2) egg diameter and (3) oil droplet, (4) fertilization and (5) hatching rate, (6) newly hatched larvae length, (7) yolk sac, and (8) oil droplet were measured. Our results found that hatch rates and egg diameter were greater in fish fed the *Ulva* diet while the oil droplet was larger for the control treatment. In terms of fatty acid profile, eggs produced while on the *Ulva* diet had higher n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA), specifically docosahexaenoic acid (C22:6n3; DHA), with consistently higher DHA/EPA ratios and fatty acid content compared to other diets. Overall, the results, in terms of morphological measurements or fatty acid profiles, suggest that the offspring obtained by females fed with *Ulva* feed would be of similar or even superior quality to other experimental feeds. The macroalgae *Ulva lactuca* can therefore be integrated into the Florida pompano aquaculture feed by up to 10 % with promising effects on reproductive performance while reducing the price of fish production and utilizing the by-products of an IMTA system.

Keywords: *Trachinotus carolinus*, partial replacement, fishmeal, *Ulva lactuca*, egg quality, larval performance, essential fatty acids, IMTA





## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	viii
RÉSUMÉ.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
TABLE DES MATIÈRES.....	xv
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
LISTE DES FIGURES.....	xx
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xxiii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 1 Fish meal substitution with IMTA-sourced <i>Ulva lactuca</i> on Florida pompano ( <i>Trachinotus carolinus</i> ) egg quality and their impact on early larval development.....	26
1.1 INTRODUCTION.....	27
1.2 MATERIAL AND METHODS.....	29
1.2.1 Diet formulation.....	29
1.2.2 Fish and experimental design.....	31
1.2.3 Broodstock spawning and sampling.....	32
1.2.4 Chemical analysis.....	35
1.2.5 Statistical analysis.....	35
1.3 RESULTS.....	36
1.3.1 Fatty acid composition of broodstock diets.....	36
1.3.2 General characteristics of egg and larvae.....	38
1.3.3 Larvae biometrics.....	39
1.3.4 Fatty acid composition of offspring between diet treatments and time.....	42
1.4 DISCUSSION.....	52
1.4.1 Dietary requirements of Florida pompano.....	53
1.4.2 Spawning performance and egg quality.....	54
1.4.3 Larval performance.....	57
1.5 CONCLUSION.....	59
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	60

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 64  
ANNEXES ..... 74

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Articles ayant fait usage d' <i>Ulva</i> spp. comme substitut alimentaire chez différentes espèces de poissons et impact(s) sur leur performance en fonction du taux de protéines et de lipides (%) pour <i>Ulva</i> spp. et de la moulée comprenant l' <i>Ulva</i> spp. ....	19
Table 2. Formulation of the <i>Ulva</i> feed (in g/100g dry weight) fed to Florida pompano <i>T. carolinus</i> broodstock. ....	30
Table 3. Proximate analysis (W/W% of dry matter, mean $\pm$ SD) of the diets (control, Breed-M, and <i>Ulva</i> ) fed to Florida Pompano ( <i>T. carolinus</i> ). W/W% = grams per 100g of sample. ....	31
Table 4. Proximate analysis (W/W% of dry matter, mean $\pm$ SD) of the diets fed to Florida Pompano ( <i>T. carolinus</i> ) larvae and juveniles during live-prey (non-enriched rotifers, enriched rotifers, <i>Artemia</i> , and enriched <i>Artemia</i> ) and weaning (Otohime B1, B2, C1 and C2) stages. ....	34
Table 5. Fatty acid composition of the diet treatments (control, Breed-M, and <i>Ulva</i> ) used to feed Florida pompano ( <i>T. carolinus</i> ) broodstock, presented as a percentage of total fatty acids (mean $\pm$ SD). Also shown are the $\omega$ -3/ $\omega$ -6, DHA/EPA, and EPA/ARA ratios as well as the mass of total fatty acid (MTFA; mg g <sup>-1</sup> dry mass). ....	37
Table 6. General characteristics of eggs and larvae (values in mean $\pm$ SD) following spawns from diet treatments (control, Breed-M, and <i>Ulva</i> ) for Florida Pompano ( <i>Trachinotus carolinus</i> ) broodstock with the number of spawning females for each diet. ....	38
Table 7. PERMANOVA main test for the FA composition of larvae according to diet (CB, BM, ULVA) and time of development. The main test shows df, Pseudo-F, and P(perm) for different sources of variation (Diet, Time, and Diet X Time), and pair-wise tests were done for Diet X Time for pairs of levels of factor "Diet" with p-value presented. ....	43
Table 8. Similarity percentage analysis (SIMPER) for each diet comparison ( <b>BM</b> for Breed- M, <b>CB</b> for Control, and <b>UM</b> for <i>Ulva</i> diet) with ontogenic stages grouped. SIMPER provided average dissimilarity (%) and the top 70 % contributing fatty acids. ....	44
Table 9. Pair-wise tests were done for SFA, MUFA, and PUFA groups between diet treatments ( <b>BM</b> = Breed-M; <b>CB</b> = control) for each ontogenic stage ( <b>A</b> = egg; <b>B</b> =newly hatched; <b>C</b> =mouth-opening; <b>D</b> = live-prey; <b>E</b> = weaning) with the p-value indicating whether it is significant between diet treatments. ....	45

Table 10. Similarity percentage analysis (SIMPER) for each diet treatment (**BM** for Breed-M, **CB** for Control, and **UM** for *Ulva* diet) and for SFA, MUFA, PUFA, and MTFA between ontogenic stages pairs. .... 47

Table 11. Fatty acid composition of eggs and newly hatched larvae (values as mean  $\pm$  SD with concentrations expressed as relative percentages of mass of total fatty acids (MTFA) for the 3 diet treatments (control, Breed-M, and *Ulva*) fed to the *Trachinotus carolinus* broodstock. .... 49

Table 12. Fatty acid composition of larvae (values as mean  $\pm$  SD), with concentrations expressed as relative percentages of mass of total fatty acids (MTFA), for the 3 diet treatments (control, Breed-M, and *Ulva*) fed to the *Trachinotus carolinus* broodstock and the ontogenic stages (mouth-opening, live-prey, and weaning stages). .... 50



## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Le volume des pêcheries commerciales et de la production aquacole de 1950 à 2018 en millions de tonnes pour les eaux terrestres et marines.....	1
Figure 2. La production en volume (millions de tonnes, Mt) de différentes espèces aquacoles pour les années 1997 et 2017 avec la contribution des espèces (A) avec les algues et les plantes aquatiques en vert, les poissons d'eau douce en bleu, les mollusques en rose, les poissons diadromes en orange.....	2
Figure 3. Les prix de la farine et des huiles de poisson (en dollars américains, \$US, par tonne) versus les farines et huiles de végétaux terrestres (farine et huile de colza, farine et huile de soja, farine et huile de tournesol) entre 2000 et 2020. .....	5
Figure 4. Pompano de Floride, <i>Trachinotus carolinus</i> .....	6
Figure 5. Cycle de vie du Pompano de Floride avec les conditions environnementales du milieu (S pour la salinité en g/L, T en °C pour la température et LT pour longueur totale) créé selon les informations compilées.....	8
Figure 6. Œuf de <i>T. carolinus</i> âgé de 5-6 heures post-fécondation (hpf) en A et larve nouvellement éclos (25 hpf) avec gouttelette d'huile et sac vitellin visibles en B.....	10
Figure 7. Système AMTI (Aquaculture Multitrophique Intégrée) du HBOI (Harbor Branch Oceanographic Institute) contient des espèces nourries (poissons et crevettes), des espèces extractives (oursins, <i>Ulva</i> et salicorne), des microalgues et un système de filtration. ....	12
Figure 8. Bassins de cueillette de macroalgues <i>Ulva lactuca</i> au FAU-HBOI à Fort Pierce en Floride (©Flavie Perron).....	13
Figure 9. Injection d'hormones HCG (Human Chorionic Gonadotropin) (A) avec le site d'injection en arrière-plan puis la fiole comprenant l'hormone utilisée à droite et cannulation (B) d'une femelle <i>T. carolinus</i> avec un tube en téflon pour vérifier la présence d'ovocytes matures (©Paul S. Wills). ....	14
Figure 10. Experimental design consisting of 4 tanks (1A, 2A, 1B and 2B) in 2 Identical Recirculating Systems with a similar number of males and females in each tank. ....	32
Figure 11. Size of the oil droplet (in µm) according to time in hours post fertilization (hpf) for larvae obtained from broodstock fed on control (▲), Breed-M (●) and <i>Ulva</i> (■) diets. ....	40

Figure 12. Length of the yolk sac (in $\mu\text{m}$ ) according to time in hours post fertilization (hpf) for larvae from control ( $\blacktriangle$ ), Breed-M ( $\bullet$ ) and <i>Ulva</i> ( $\blacksquare$ ) diets. ....	41
Figure 13. Length (in $\mu\text{m}$ ) of larvae according to time in hours post fertilization (hpf) from control ( $\blacktriangle$ ), Breed-M ( $\bullet$ ) and <i>Ulva</i> ( $\blacksquare$ ) diets. ....	42
Figure 14. Distance-based redundancy analysis (dbRDA) on the Bray-Curtis dissimilarity matrix for fatty acid profile (in relative percentages) of larvae obtained from broodstock fed different diets and of different ontogenic stages (embryonic, mouth-opening, live-prey, and weaning) with an 85% similarity between samples (circled in black) which were confirmed with a cluster diagram. ....	52





## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

<b>n-3</b>	Oméga-3
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de carbone
<b>SUS</b>	Dollar américain
<b>hpf</b>	Heure post-fécondation
<b>HBOI</b>	Harbor Branch Oceanographic Institute
<b>FAU</b>	Florida Atlantic University
<b>RAS</b>	Système d'aquaculture en recirculation
<b>AMTI</b>	Aquaculture multitrophique intégrée
<b>HCG</b>	Hormone gonadotrophine chorionique humaine
<b>DPH</b>	Jour post-éclosion
<b>FM</b>	Farine de poisson
<b>FO</b>	Huile de poisson
<b>LC-PUFA</b>	Acide gras polyinsaturé à longue chaîne
<b>DHA</b>	Acide docosahexaénoïque
<b>EPA</b>	Acide eicosapentaénoïque
<b>ARA</b>	Acide arachidonique
<b>AGE</b>	Acides gras essentiels
<b>SBM</b>	Tourteau de soja
<b>AGPI-18C</b>	Acide gras polyinsaturé à 18 carbones



## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### 1. MISE EN CONTEXTE

La croissance démographique mondiale, conjointement avec le développement économique, augmente la demande pour les produits de la mer (Merino *et al.*, 2012). Cependant, plus de 80 % des ressources marines sont exploitées au maximum par la pêche commerciale de stocks sauvages, atteignant un plateau d'environ 80 millions de tonnes chaque année depuis les années 1990 (Figure 1) (FAO, 2020). L'aquaculture, représentant déjà près de 50 % de la production globale en produits de la mer, devient ainsi indispensable pour garantir l'approvisionnement alimentaire en protéines animales (Figure 1) (Merino *et al.*, 2012 ; FAO, 2020).

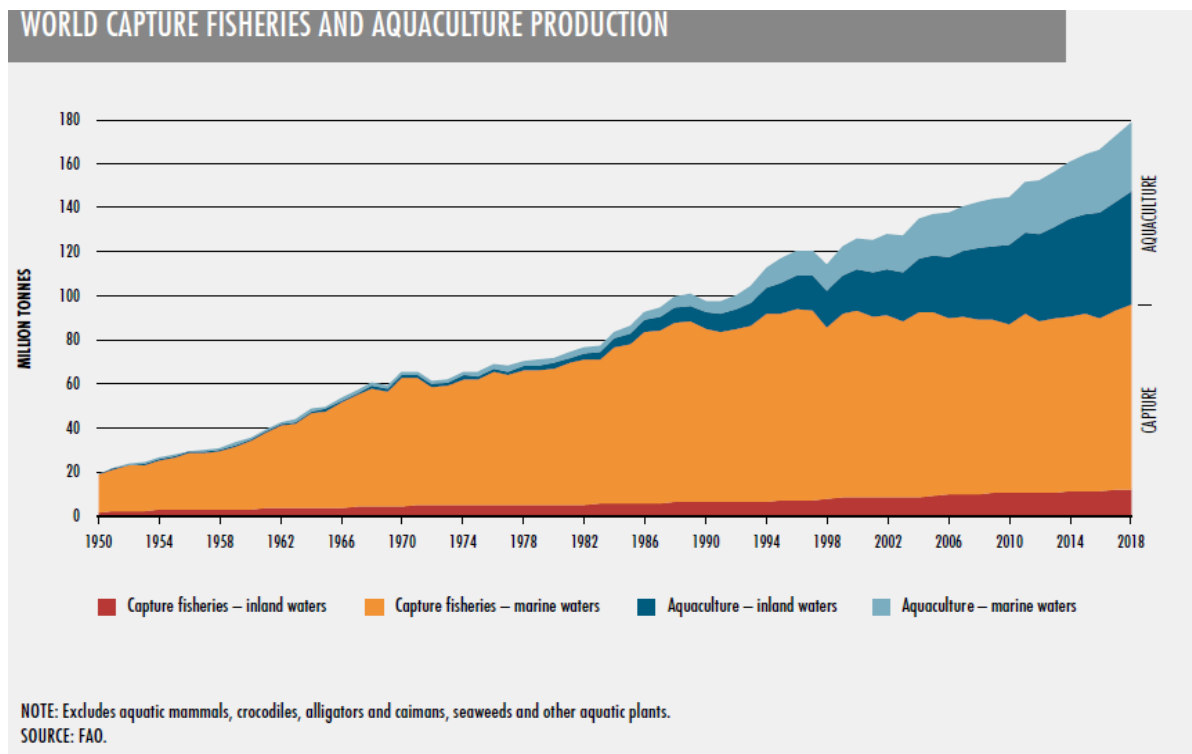


Figure 1. Le volume des pêcheries commerciales et de la production aquacole de 1950 à 2018 en millions de tonnes pour les eaux terrestres et marines. Figure tirée de FAO (2020).

De ce fait, l'industrie aquacole connaît une croissance exponentielle, augmentant de 8 % annuellement, et ce, depuis les années 1970, ce qui en fait le secteur alimentaire et agricole ayant la croissance la plus rapide (Merino *et al.*, 2012). La production globale aquacole a plus que triplé en volume de 1997 à 2017, passant de 43 à 112 millions de tonnes (Figure 2).

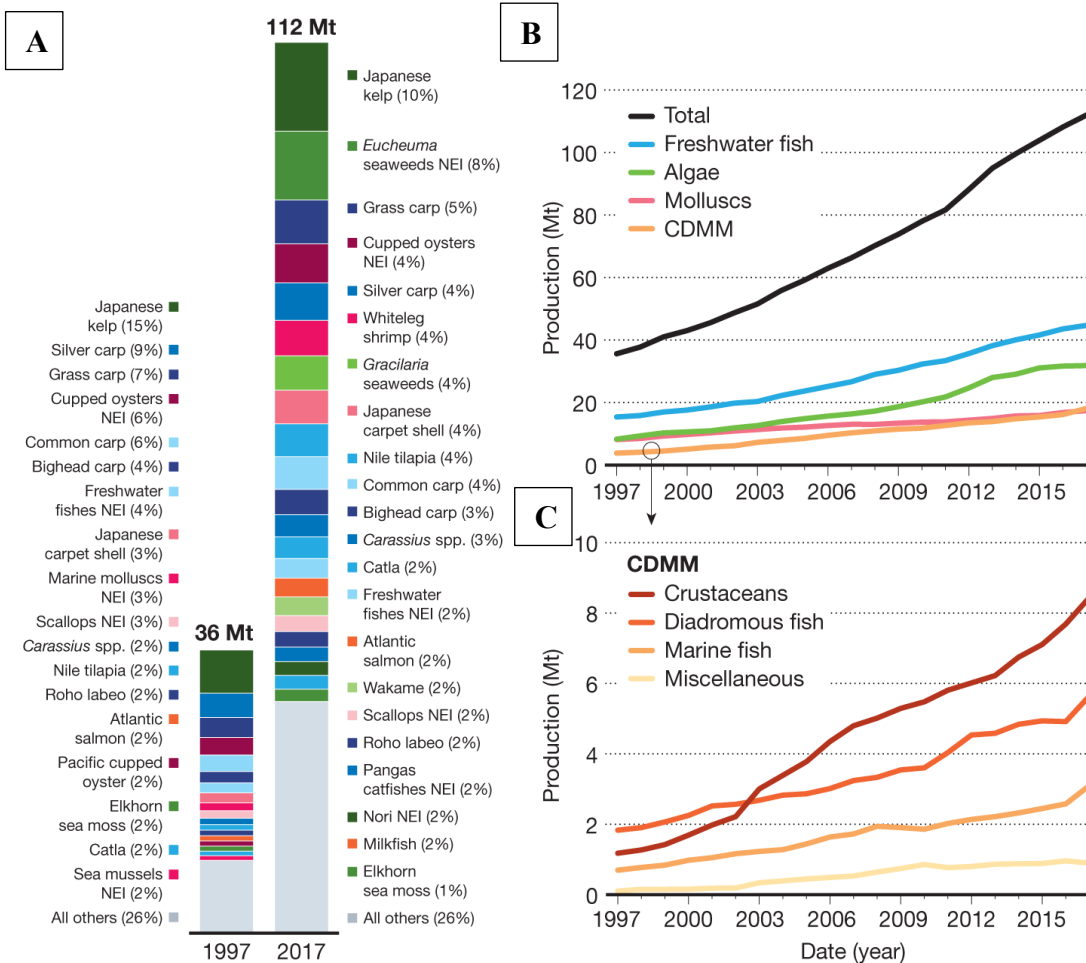


Figure 2. La production en volume (millions de tonnes, Mt) de différentes espèces aquacoles pour les années 1997 et 2017 avec la contribution des espèces (A) avec les algues et plantes aquatiques en vert, les poissons d'eau douce en bleu, les mollusques en rose, et les poissons diadromes en orange. La croissance de la production totale, pour le même intervalle d'années, de différents groupes, les poissons d'eau douce, les algues, les mollusques et CDMM (B)

puis les groupes constituant le CDMM (crustacés, poissons diadromes et marins puis les espèces autres) sont agrandis en C. Figure tirée de Naylor *et al.* (2021).

Les principaux groupes contribuant à ce volume sont les poissons d'eau douce (par ex. carpe, poisson-chat et tilapia), les algues et les bivalves, alors que les poissons diadromes et les poissons marins représentent les volumes les plus faibles, avec respectivement 6 et 3 millions de tonnes environ (Figure 2) (Naylor *et al.*, 2021). La pisciculture, majoritairement des poissons d'eau douce, représente aujourd'hui près de 75 % du volume aquacole total. Elle reflète le secteur ayant la plus grande valeur économique, une valeur évaluée à plus de 138 milliards de dollars américains (Tacon, 2018 ; Naylor *et al.*, 2021). Cette croissance commerciale de l'industrie aquacole est cruciale pour répondre aux besoins alimentaires de près de 760 millions de personnes sous-alimentées, retrouvées essentiellement en Asie et en Afrique (FAO, 2020). Elle permettrait également de réduire la pression écologique que les pêcheries imposent sur les stocks sauvages (FAO, 2020 ; Cottrell *et al.*, 2021).

Cette expansion est notamment marquée par une diversification progressive avec une industrie aquacole qui est 40% plus variée qu'au début des années 2000 avec environ 425 espèces de poissons, mollusques, plantes aquatiques, et algues (FAO, 2020 ; Naylor *et al.*, 2021 ; Cai *et al.*, 2023). Malgré la diversité plus importante de la pisciculture comparativement aux autres sous-secteurs aquacoles, environ 20 espèces, majoritairement d'eau douce, contribuent à plus de 80 % de la production totale (FAO, 2020). Pourtant, une diversification des espèces aquacoles pourrait être avantageuse pour l'industrie. D'un point de vue économique, la saturation du marché actuel pourrait être nettement atténuée en élargissant la base de la clientèle et en proposant une diversité élargie de produits aquatiques aux consommateurs. Quant aux techniques d'élevage, la polyculture de plusieurs organismes aquatiques dans un même système permettrait d'améliorer l'efficacité de production en optimisant l'utilisation de différents groupes écosystémiques (Cai *et al.*, 2023). Néanmoins, en tenant compte des limitations d'utilisation de l'eau douce, le développement futur de l'aquaculture doit être plus diversifié. La production de poissons marins est une avenue particulièrement prometteuse en raison de son impact environnemental réduit. Effectivement,

cette pratique nécessite une faible utilisation d'eau douce et produit peu de CO<sub>2</sub> et de rejets azotés lorsque les effluents du système sont bien traités (Gephart *et al.*, 2023).

Toutefois, une des problématiques majeures de la production de poissons marins, surtout pour les espèces carnivores, telles que le saumon atlantique et la truite arc-en-ciel, qui sont particulièrement prisées sur le marché nord-américain et européen, est l'utilisation des farines et des huiles de poisson (FAO, 2020 ; Garlock *et al.*, 2020). Ces sources de protéines animales étaient initialement utilisées comme ingrédients dans les moulées aquacoles en raison de leur faible coût et de leur forte palatabilité pour les espèces en élevage, en plus de subvenir aux besoins nutritionnels de poissons en termes de protéines et d'acides gras (Cottrell *et al.*, 2021). En revanche, près du quart de toutes les pêches commerciales sont utilisées pour fabriquer ces ingrédients, ce qui démontre les besoins importants des espèces carnivores et qui accentue les dommages environnementaux causés au milieu marin (Naylor *et al.*, 2000). La production de poissons marins et diadromes ne peut s'accroître sans d'abord réduire la pression sur les stocks de poissons sauvages et leur utilisation subséquente dans les moulées aquacoles (Naylor *et al.*, 2000). Conséquemment, bien que l'industrie ait produit trois fois plus de poissons d'élevage de 2000 à 2017, les débarquements de poissons-fourrages (utilisés pour la production de farine et huile de poisson) ont diminué de 23 à 16 millions de tonnes (Naylor *et al.*, 2021). Pour la même période temporelle, la production de farine de poissons a diminué de 6,6 à 4,8 millions de tonnes alors que la production d'huile de poisson a diminué de 1,5 à 1,0 million de tonnes, et est restée relativement stable au cours de la dernière décennie (Naylor *et al.*, 2021). Toutefois, la fraction de la farine de poissons globale utilisée par le secteur aquacole, lorsque comparée à l'allocation au bétail ou à des usages non alimentaires, a augmenté de 33 à 69 % entre 2000 et 2016, alors que cette fraction pour l'huile de poisson a augmenté de 55 à 75 %. Il semble donc impératif pour les fermes aquacoles de réduire la portion de ces protéines animales dans les moulées commerciales puisqu'une progression de cette tendance pourrait faire perdurer la hausse des prix actuels tout en maintenant une pression environnementale négative.

Ainsi, depuis le début des années 2000, des recherches importantes se sont orientées vers des alternatives pour les farines et les huiles de poisson dont les prix ont plus que doublé au cours des années 2000, atteignant respectivement 1600 \$ US et 900-1800 \$ US, soit des coûts nettement supérieurs à ceux des farines et huiles végétales terrestres (Figure 3) (Naylor *et al.*, 2021).

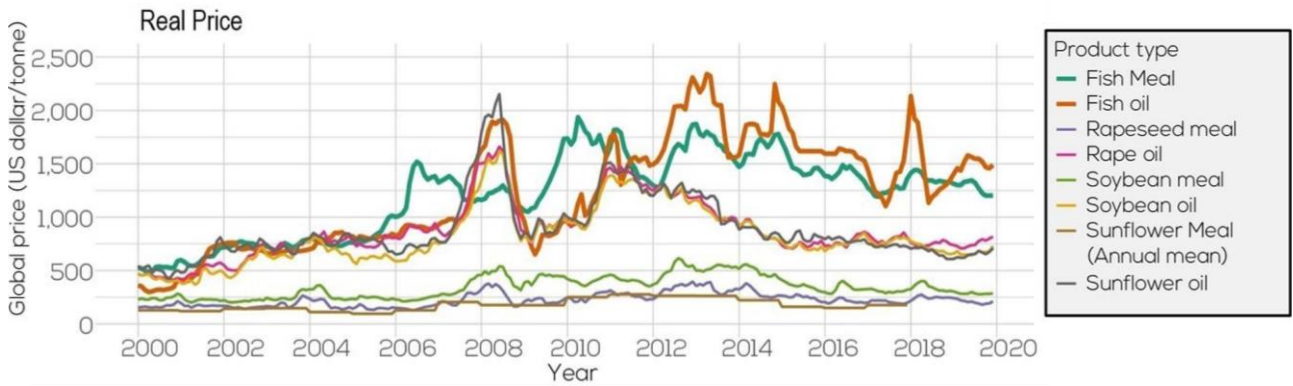


Figure 3. Les prix de la farine et des huiles de poisson (en dollars américains, \$ US, par tonne) versus les farines et huiles de végétaux terrestres (farine et huile de colza, farine et huile de soja, farine et huile de tournesol) entre 2000 et 2020. Les données ont été ajustées en fonction du déflateur implicite du PIB dans le but de corriger les influences de l'inflation des données économiques. Figure tirée et modifiée de Naylor *et al.* (2021).

Cependant, pour qu'un substitut alimentaire de la farine de poisson soit considéré, il doit posséder un profil nutritionnel acceptable, être rapidement disponible et de faible coût, être agréable au goût pour les espèces aquacoles, comprendre peu de facteurs anti-nutritionnels et être facile à digérer (Hodar *et al.*, 2020). La recherche actuelle a tout de même permis de diminuer grandement l'utilisation des farines et huiles de poissons. Pour 44 kilotonnes de poissons et de crustacés produits en aquaculture en 2017, 12 kilotonnes de poissons sauvages ont été utilisées (Naylor *et al.*, 2021). La recherche pour des substituts provenant de plantes terrestres et d'insectes est présentement ralentie, notamment par la présence d'éléments anti-nutritionnels, des déficiences en acides aminés et en acides gras essentiels, des niveaux élevés de fibres et d'amidons solubles, une digestibilité et une biodisponibilité des nutriments réduites en plus d'une faible appétence pour les espèces

aquacoles (Daniel, 2018). De plus, les animaux marins ont des capacités très réduites de biosynthèse des acides gras polyinsaturés, tels que les omégas 3 et 6, et doivent donc obtenir les acides gras essentiels directement de leur alimentation (Glencross, 2009). Des alternatives marines végétales, comprenant des niveaux non négligeables en acides gras, tels que les macroalgues, semblent plus adéquates afin de réduire les impacts écologiques de l'aquaculture de poissons carnivores tout en respectant leurs besoins nutritionnels.

## 2. BIOLOGIE DE L'ESPÈCE

Le Pompano de Floride (*Trachinotus carolinus*) est un poisson marin d'eau chaude, membre de la famille des Carangidés. Il se distingue par son corps comprimé et une coloration corporelle variant d'un argenté bleu-vert sur la partie dorsale puis de l'argent au jaune sur le reste du corps, incluant les nageoires (Figure 4). Il peut atteindre une longueur totale de 63 cm avec un poids de 4 kg, bien qu'il soit plus commun de retrouver des poissons entre 25-40 cm et entre 0,5-1,0 kg (Gilbert et Parsons, 1986).



Figure 4. Pompano de Floride, *Trachinotus carolinus* (©Flavie Perron).

Le Pompano est une espèce carnivore d'intérêt commercial autant que pour la pêche sportive et retrouvée en bancs dans les eaux côtières peu profondes de l'état du Massachusetts jusqu'au Brésil, avec une omniprésence notée près des côtes de la Floride (Groat, 2002). Près



de 90 % des débarquements de Pompanos proviennent de cet état (Groat, 2002 ; Derbes II, 2017). De plus, *T. carolinus* est une espèce qui peut tolérer une large gamme de conditions environnementales, par exemple un niveau d'oxygène dissous aussi faible que 4 mg/L et une salinité de 5 g/L pour des poissons acclimatés, bien qu'ils préfèrent une salinité entre 28 et 37 g/L (Moe *et al.*, 1968 ; Gilbert et Parsons, 1986). Le Pompano est normalement retrouvé dans des eaux chaudes entre 25-32 °C, mais des juvéniles ont déjà été retrouvés dans des eaux de 34 °C (Main *et al.*, 2007). Toutefois, la température est le facteur le plus contraignant pour le Pompano, puisqu'il ne tolère pas les faibles températures (< 20 °C) avec des mortalités de masse recensées près de 10-12 °C (Kumpf, 1972).

Le cycle vital et les particularités écologiques de ce poisson ne sont pas encore bien connus et se basent majoritairement sur les connaissances acquises sur la population du sud-est des États-Unis (Main *et al.*, 2007). Cette espèce est généralement retrouvée en estuaires ou dans les baies, mais elle est surtout observée en eaux salées près des plages (Derbes II, 2017). Les juvéniles vont rejoindre les bordures des plages à partir du mois d'avril jusqu'en novembre pour y passer la majorité de leur cycle vital. Leur alimentation est opportuniste et ils se nourrissent de nombreux organismes pélagiques et benthiques (Groat, 2002 ; Gothreaux, 2008 ; Denadai *et al.*, 2013). Ils vont ensuite rejoindre le large dès qu'ils auront une longueur totale d'environ 15 cm ou dès que la température sera au-dessous de 19 °C (Figure 5) (Gothreaux, 2008 ; Denadai *et al.*, 2013). Les adultes vont vivre jusqu'à 3-4 ans (voire jusqu'à 7 ans) et se retrouveront généralement jusqu'à 60 m de profondeur au large des côtes. Toutefois, ils resteront fidèles à leur habitat d'alevinage en eaux côtières et vont se nourrir de façon diurne et selon le cycle tidal, sur une large diversité de polychètes, crustacés (crabetaupes et *Emerita* spp.), bivalves (ex. *Donax variabilis*), et de poissons (Gothreaux, 2008). Ils vont également se déplacer et migrer le long des côtes selon l'isotherme de 15 °C, soit vers le nord au printemps et au sud en hiver, bien que les patrons migratoires saisonniers ne soient pas encore bien connus (Berry et Iversen, 1967 ; Murphy *et al.*, 2008).

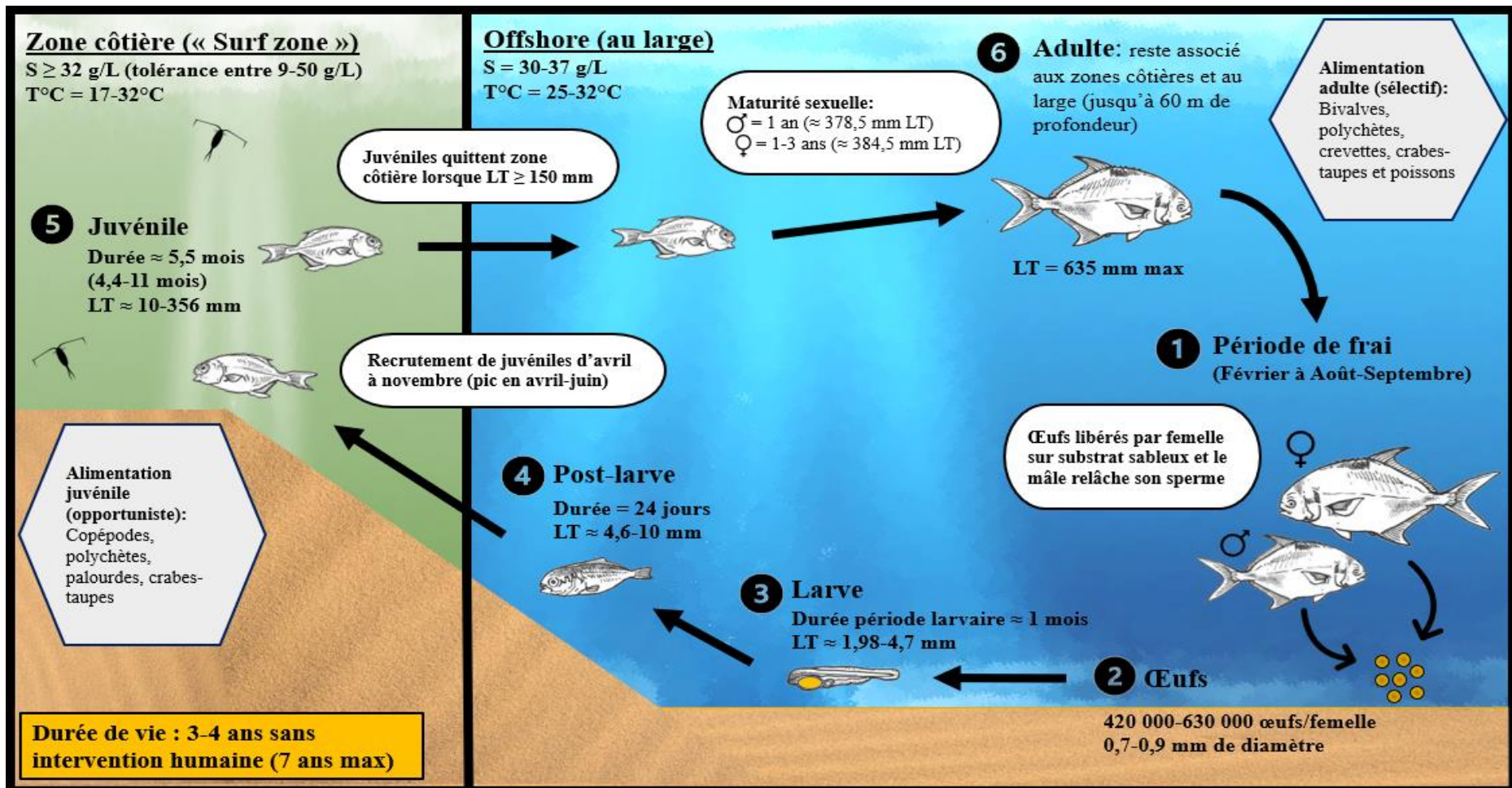


Figure 5. Cycle de vie du Pompano de Floride (*Trachinotus carolinus*) avec les conditions environnementales du milieu (S pour la salinité en g/L, T en °C pour la température et LT pour longueur totale) créé selon les informations compilées (Berry et Iversen, 1967 ; Kumpf, 1972 ; Groat, 2002 ; Muller *et al.*, 2002 ; Main *et al.*, 2007 ; Gothreaux, 2008 ; Murphy *et al.*, 2008 ; Denadai *et al.*, 2013 ; Weirich *et al.*, 2021) (©Flavie Perron).

Le frai n'a jamais encore été observé en milieu naturel et les spéculations ne se basent que sur des observations des stades larvaires selon l'environnement et le mois de récolte (Groat, 2002). Puisque des larves ont été échantillonnées au large des côtes sud-est des États-Unis (ex. Floride et Caroline du Sud), il est suggéré que le frai s'y déroulerait bien que le site de frai soit encore débattu (Finucane, 1969 ; Main *et al.*, 2007 ; Weirich *et al.*, 2021). La reproduction de cette espèce se ferait sur une période prolongée et s'étendrait de février à octobre (Main *et al.*, 2007 ; Weirich *et al.*, 2021), mais il est possible que le frai ait lieu tout au long de l'année dans le golfe du Mexique et dans la mer des Caraïbes (Main *et al.*, 2007). Les mâles vont devenir matures sexuellement vers l'âge d'un an, alors que les femelles seront matures plutôt vers 2-3 ans à un poids se situant entre 0,7 et 2,3 kg selon ces mêmes auteurs. Le comportement reproducteur du Pompano a été décrit par Kloth (1980), qui a rapporté que la femelle restait stationnaire alors que le mâle se positionnait en dessous de celle-ci pour féconder les œufs relâchés. Les œufs flotteraient ensuite en surface, définissant ainsi le succès de fécondation.

Les œufs du Pompano sont nombreux, soit entre 100 000-800 000 œufs/femelle par saison de reproduction, et petits, avec un diamètre de 0,7-1,0 mm, comprenant une gouttelette d'huile et un sac vitellin (Figure 6A) (Main *et al.*, 2007 ; Gothreaux, 2008). Ces œufs pélagiques, comme les larves, auraient besoin d'un environnement de salinité élevée (32-37 g/L) pour assurer une meilleure flottabilité et leur survie (Kumpf, 1972 ; Main *et al.*, 2007). Les larves vont éclore 24-25 heures post-fécondation (hpf) avec une taille d'environ 2,0 mm (Figure 6B) et resteraient au large pendant leur premier mois de vie avant de migrer vers les côtes (« surf zone »), lorsque le stade juvénile est atteint (Figure 5) (Weirich *et al.*, 2021).

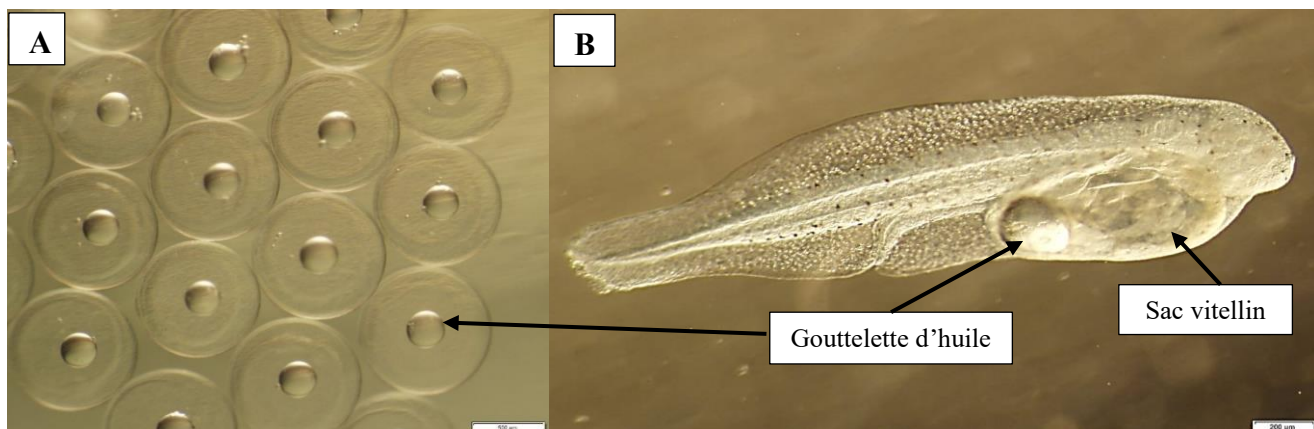


Figure 6. Œufs de *T. carolinus* âgés de 5-6 heures post-fécondation (hpf) en **A** et larve nouvellement éclos (25 hpf) avec gouttelette d'huile et sac vitellin visibles en **B**. L'échelle de l'image **A** est de 500 µm et de 200 µm pour l'image **B** (©Flavie Perron).

Les larves se nourrissent de leurs réserves endogènes, c'est-à-dire leur gouttelette d'huile et leur sac vitellin, pour les 2-3 premiers jours de vie (Figure 6). Ces réserves sont essentielles au développement d'organes et de structures morphologiques nécessaires à l'alimentation exogène, telles que la pigmentation des yeux, la formation du tube digestif et l'ouverture de la bouche (Derbes II, 2017). Elles se nourrissent par la suite de plancton, tel que les copépodes.

### 3. RECHERCHE ET APPLICATIONS EN AQUACULTURE

#### 3.1 Développement et techniques d'élevage

Le Pompano de Floride est un poisson des plus dispendieux aux États-Unis, en raison de l'imprédictibilité de l'état du stock sauvage avec des débarquements en 2019 et 2022 d'environ 184 et 72 tonnes métriques respectivement, particulièrement dans les États de Floride, Virginie et Louisiane (données de NOAA Fisheries (Floride, États-Unis ; <https://www.fisheries.noaa.gov/foss/>)) (Weirich *et al.*, 2021). Ainsi, la demande grandissante pour cette espèce, quoique limitée, a fait grimper la valeur marchande du poisson à près de 10 \$ US / kg pour le poisson complet et à près de 40 \$ US / kg pour un filet de poisson d'élevage (Jackson *et al.*, 2020 ; Weirich *et al.*, 2021). La forte valeur économique de

l'espèce, sa croissance rapide, sa grande tolérance environnementale et sa facilité d'élevage font de cette espèce un candidat idéal en aquaculture (Gothreaux, 2008 ; Jackson *et al.*, 2020). Cependant, l'approvisionnement en Pompano reste essentiellement lié aux pêcheries commerciales, puisque les poissons d'aquaculture sont utilisés surtout pour la recherche ou à des fins privées et non à des fins commerciales (Derbes II, 2017).

Des efforts d'élevage à des fins commerciales ont débuté dans les années 1950 en expérimentant différentes méthodes de production (Weirich *et al.*, 2021). Une première tentative de production de juvéniles sauvages en étang a eu lieu en Floride, suivie d'une production commerciale en bassins dans le même État ainsi qu'en République Dominicaine (McMaster, 1988). Vers la fin des années 1970 et au début des années 1980, la polyculture en étang de Pompano et de crevettes a été tentée en Alabama, US, puis au Venezuela avec une production en bassins d'eau salée et en cages flottantes (Tatum et Trimble, 1978 ; Gomez et Scelzo, 1982 ; Gomez et Cervigon, 1987). Cependant, des problèmes récurrents associés à des régimes alimentaires inadéquats, des conditions thermiques non optimales, puis des proliférations de maladies ont réduit la survie et la croissance des Pompano et limité la production à des individus dont la masse n'excédait pas 450 g.

Un partenariat récent entre le Harbor Branch Oceanographic Institute (HBOI) du Florida Atlantic University (FAU) et du Mote Marine Laboratory a permis la mise en place d'un système d'aquaculture à recirculation (RAS) intégrant les principes d'une aquaculture multitrophique intégrée (AMTI) pour améliorer la viabilité et la progression durable de l'aquaculture (Derbes II, 2017). Une AMTI est un système de production circulaire qui utilise un réseau trophique simplifié avec plusieurs composantes écosystémiques, telles que des espèces nourries (ex. poissons et/ou crevettes) et des espèces extractives (ex. mollusques et macroalgues) (Carballeira Braña *et al.*, 2021). Ces dernières vont recycler les fèces et les excès alimentaires et les transformer en sources de nutriments, dont des acides gras essentiels, accessibles pour les organismes du système (Carballeira Braña *et al.*, 2021). Le système expérimental du HBOI, qui est en activité depuis 9 ans, contient des poissons marins comme des Pompanos, ou du Cobia (*Rachycentron canadum*) et du tambour rouge (*Sciaenops*

*ocellatus*), avec des crevettes marines (*Litopenaeus vannamei*) et des macroalgues (*Ulva lactuca*) et ne nécessite qu'un ajout de 0,5 % d'eau neuve par jour (Figure 7).

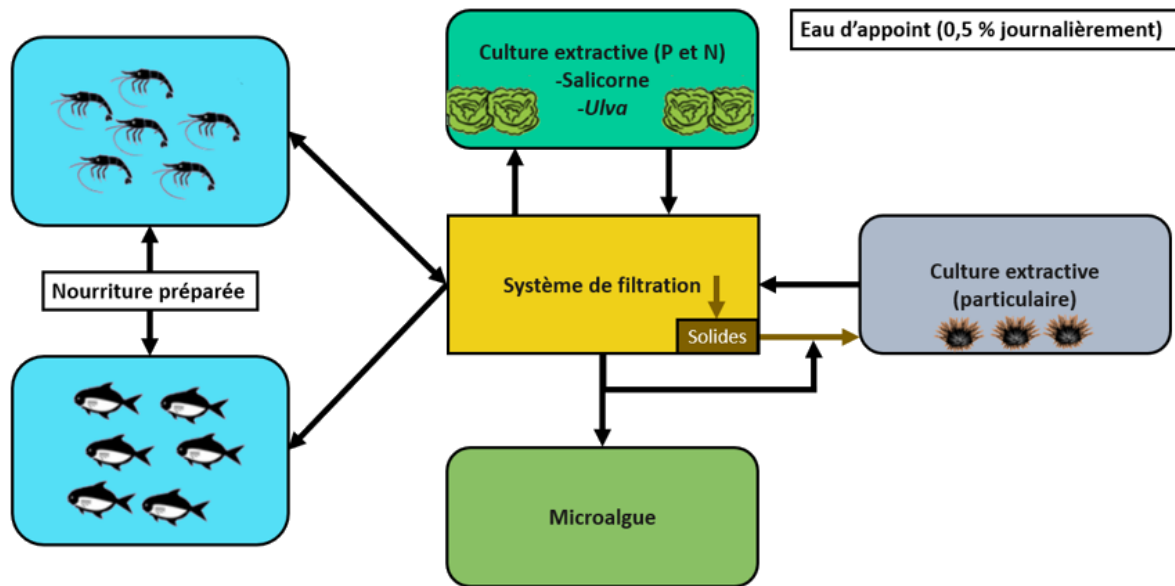


Figure 7. Système AMTI (Aquaculture Multitrophique Intégrée) du HBOI (Harbor Branch Oceanographic Institute) contient des espèces nourries (poissons et crevettes), des espèces extractives (oursins, *Ulva* et salicorne), des microalgues et un système de filtration.

Les macroalgues sont une composante essentielle du système, en raison de leur rôle de biofiltreur corrigeant les niveaux en nutriments, en CO<sub>2</sub>, et en stabilisant l'acidité du système tout en améliorant les niveaux en oxygène dissous (Carballeira Braña *et al.*, 2021). Ce rôle de biofiltration permet de réduire les coûts associés au traitement des eaux de rejet piscicole tout en étant une ressource disponible à l'année pour des usages commerciaux ou alimentaires (Shpigel *et al.*, 2017). La capacité d'absorption nutritionnelle des algues, telles que *Ulva spp.*, est intéressante pour le système AMTI, puisqu'elle élimine plus de 80 % des composés azotés produits par les poissons ou crustacés en élevage (Figure 8) (Marinho *et al.*, 2013 ; Laramore *et al.*, 2018).



Figure 8. Bassins de cueillette de macroalgues *Ulva lactuca* au FAU-HBOI à Fort Pierce en Floride (©Flavie Perron).

L'utilisation d'un système AMTI permet ainsi des rendements plus importants pour chaque composante écosystémique comparativement à des systèmes ne comprenant qu'une seule espèce aquacole, tout en diminuant les impacts environnementaux et en augmentant l'acceptabilité sociale des consommateurs vis-à-vis à l'aquaculture (Carballeira Braña *et al.*, 2021). Cet excès de biomasse algale produite, riche en protéines et en acides gras essentiels, peut ensuite être utilisé comme substitut alimentaire pour d'autres espèces aquacoles (Marinho *et al.*, 2013). Parmi les nombreuses améliorations technologiques depuis les années 1970, l'intégration de poissons en système RAS a été encouragée puisqu'elle permet d'obtenir un milieu contrôlé permettant aux poissons d'atteindre rapidement leur maturité sexuelle (Derbes II, 2017).

### 3.2 Reproduction et larviculture

Au cours des années 1970, des efforts ont été faits pour améliorer les techniques de ponte et la production larvaire de l'espèce en Floride. Hoff *et al.* (1978) ont réussi à conditionner des géniteurs de Pompano et obtenir des pontes spontanées en faisant varier les conditions photothermiques, pour simuler les saisons, en plus d'administrer des hormones gonadotrophines chorioniques humaines (hCG ; Figure 9A) pour un meilleur contrôle quant au jour de ponte. Selon les mêmes auteurs, les géniteurs ont été exposés à une température de 28 °C pour une période de 8 semaines afin d'accélérer la maturation et le développement des ovocytes. Par la suite, le prélèvement d'ovocytes à l'aide d'une canule (Figure 9B) a permis de déterminer si le stade de développement des ovocytes était suffisamment avancé pour injecter des hormones pour stimuler la ponte. Cette méthodologie est toujours utilisée aujourd'hui (Wills *et al.* 2023).



Figure 9. Injection d'hormones (human Chorionic Gonadotropin (hGC) (A) avec le site d'injection en arrière-plan puis la fiole contenant l'hormone utilisée à droite et canulation (B) d'une femelle *T. carolinus* avec un tube en téflon pour vérifier la présence d'ovocytes matures (©Paul S. Wills).

Les poissons pondent de 24 à 48 heures post-injection et les larves sont élevées jusqu'à la métamorphose (vers 24 jours post-éclosion, DPH), en les alimentant de plancton tel que des protozoaires, rotifères et nauplius d'artémies et de copépodes comme régime alimentaire représentatif du milieu naturel (Hoff *et al.*, 1978). Les femelles en captivité produisent des



œufs à taux de fécondation similaire aux femelles sauvages, permettant ainsi la survie de suffisamment de progénitures pour soutenir et valider la faisabilité d'une larviculture pour le Pompano (Weirich et Riley, 2007).

Au cours des années 2000, une avancée importante sur la culture de poissons marins a fait resurgir l'intérêt d'élevage de Pompano. En effet, le développement de la production aquacole de poissons marins est principalement ralenti par le manque d'information et la difficulté concernant leur reproduction et l'élevage des premiers stades de vie (Derbes II, 2017). De plus, il est difficile de produire de façon stable et fiable un stock de larves et de juvéniles qui permet de subvenir à la bonne continuité d'opérations aquacoles. Selon Derbes II (2017), le Pompano est une espèce reconnue quant à ses œufs avec des taux de fécondation largement variables et des taux de survie sous le seuil de 25 %. Or, il serait pertinent de développer et de finaliser des protocoles spécialisés pour optimiser la performance des géniteurs et des larves produites. Ceci permettrait de contrer la forte variabilité de la qualité des pontes et des œufs résultants, qui freine le potentiel commercial aquacole de l'espèce (Derbes II, 2017).

#### **4. PROBLÉMATIQUE**

##### **4.1 Alimentation et besoins nutritionnels des géniteurs**

Le défi à produire des œufs et larves de qualité supérieure est lié directement à la nutrition maternelle des espèces de poissons marins. Présentement, de nombreuses fermes aquacoles font usage simplement de morceaux appâtés de poissons et/ou d'invertébrés congelés pour simuler une alimentation du poisson à l'état sauvage (FAO, 2020). Cette nourriture est normalement utilisée lorsque les besoins nutritionnels spécifiques de l'espèce ne sont pas encore bien connus. Une alimentation non optimale (ex. faible contenu protéique et lipidique) peut engendrer des difficultés quant à la fécondité et la qualité de ponte, le taux de fécondation puis la croissance larvaire (Fernández-Palacios *et al.*, 2011). Pour optimiser la

production commerciale de Pompano, il est donc nécessaire de créer une moulée à faible coût et durable (Rossi Jr et Davis, 2012 ; Riche, 2015).

La pisciculture marine repose actuellement sur des moulées commerciales riches en protéines animales incorporant de la farine de poisson (FM) et des huiles de poisson (FO) (Lech et Reigh, 2012). Ces moulées aquacoles peuvent représenter jusqu'à 70 % des coûts associés à la production de poissons d'élevage (Riche, 2015) en raison, entre autres, de la présence de FM qui peut constituer 50 % de la formulation du régime. Puisque les espèces de poissons carnivores nécessitent entre 40 et 50 % de protéines dans leur nourriture, la FM est optimale en raison de sa haute valeur nutritionnelle (par ex. 60-72 % de protéines et 5- 12 % de lipides) et de son appétence pour les poissons, bien qu'elle soit une protéine très coûteuse avec une disponibilité qui varie de façon saisonnière (Lech et Reigh, 2012 ; Shepherd et Jackson, 2013 ; Riche, 2015 ; Naylor *et al.*, 2021). La FM et la FO sont également une source primaire de lipides particulièrement en termes d'acides gras. Par exemple, la FO est la source marine de base en acides gras n-3 polyinsaturés de 20 atomes de carbone ou plus (LC-PUFA), tels que les acides docosahexaénoïques (DHA), les acides eicosapentaénoïques (EPA) et les acides arachidoniques (ARA), qui sont considérés comme essentiels (AGE) pour la survie et le développement des poissons à partir de l'état embryonnaire et larvaire (Glencross, 2009).

Toutefois, l'utilisation de poissons-fourrages en provenance de pêcheries commerciales pour produire la FM et la FO soulève des questions écologiques et éthiques (FAO, 2020 ; Shpigel *et al.*, 2017). Les pêcheries commerciales ne peuvent plus suivre la demande grandissante en protéines animales et sont stagnantes, voire en diminution, et ne peuvent supporter le marché aquacole actuel et futur (Kissinger *et al.*, 2016). Autrement dit, au rythme actuel, il n'est pas possible pour la FM ni la FO de figurer comme protéine durable en vue d'une industrie aquacole croissante. Il faut alors trouver des alternatives au FM de valeur nutritionnelle similaire et sans impact sur la santé ou les performances physiologiques des espèces aquacoles (Kissinger *et al.*, 2016 ; Riche *et al.*, 2023). De nombreuses alternatives végétales terrestres ont été explorées pour remplacer la FM et la FO, ces alternatives étant

plus abondantes, rapidement disponibles et de plus faible coût (Lazzarotto *et al.*, 2015 ; Naylor *et al.*, 2021 ; Nandi *et al.*, 2023).

## 4.2 Substituts alimentaires de la farine de poisson

Le tourteau de soja (SBM) est un substitut alimentaire communément utilisé pour remplacer la FM. Il comprend une qualité stable avec un taux élevé en protéines, mais celui-ci doit être compensé par d'autres sources, telles que la farine de gluten de blé et de maïs, pour contrebalancer son faible taux en méthionine (Kissinger *et al.*, 2016 ; Hodar *et al.*, 2020). De ce fait, les substituts de nature végétale sont souvent déficients en acides aminés essentiels tels que la lysine, la méthionine, la thréonine et le tryptophane (Silva *et al.*, 2015). Un remplacement total de la FM s'avère problématique dans l'alimentation de poissons carnivores, car malgré que les protéines terrestres soient généralement riches en glucides et en fibres, elles comprennent des composés antinutritionnels, provoquant une diminution du taux de croissance en plus de nuire à la digestion du poisson (Lazzarotto *et al.*, 2015 ; Khanzadeh *et al.*, 2016). De plus, ces options terrestres, comprenant entre autres les huiles de palme et de soja, ne conviennent généralement pas à plusieurs espèces marines ayant des besoins importants en AGE tels que les n-3 LC-PUFAs pour le conditionnement et le rendement reproductif des géniteurs puis pour le succès de la survie et du développement larvaire (Fernández-Palacios *et al.*, 1995 ; Turchini *et al.*, 2009 ; Wei *et al.*, 2022). Ces huiles sont principalement riches en acides gras polyinsaturés à 18 carbones (AGPI-18C), mais la capacité limitée des poissons marins à biosynthétiser les AGPI-18C en DHA, EPA et ARA nécessitent donc leur incorporation dans leur nourriture (Glencross, 2009). Pourtant, le Pompano aurait une certaine capacité de transformation des AGPI-18C en AGEs (Bradshaw II *et al.*, 2023 ; Mejri *et al.*, 2021).

Des alternatives plutôt de source marine ont été explorées, telles que les microalgues (ex. *Spirulina platensis*) et les macroalgues, puisqu'elles auraient un contenu élevé en acides aminés essentiels généralement supérieurs aux végétaux terrestres (Silva *et al.*, 2015). La substitution de la FM par de la spiruline *S. platensis* était optimale et recommandée entre 8,1

et 9,6 % pour le rendement reproductif du gourami *Trichopodus trichopterus* en termes de fécondité, d'indice gonadosomatique, puis du taux d'éclosion des œufs (Khanzadeh *et al.*, 2016). Les macroalgues, quant à elles, ont également déjà été intégrées à la nourriture de différents organismes aquatiques, tels que des mollusques (ex. ormeau), des crustacés (ex. crevettes) et de nombreuses espèces de poissons (Laramore *et al.*, 2018). Plusieurs articles ont fait état de l'usage de différentes espèces de macroalgues à 5 à 10 % de substitution de FM, telles qu'*Ascophyllum nodosum*, *Gracilaria cornea*, *Gracilaria bursa-pastoris*, *Porphyra* et *Ulva lactuca* (Silva *et al.*, 2015). Ce faible pourcentage d'inclusion dans les moulées aquacoles permettrait d'améliorer les taux de croissance, la qualité de la chair et la résistance aux maladies pour plusieurs espèces piscicoles, tout en réduisant les coûts associés à la production industrielle (Shpigel *et al.*, 2017 ; Hodar *et al.*, 2020). Selon Marinho *et al.* (2013), une inclusion de 10 % de *Porphyra* et de *Ulva rigida* a été réalisée sans affecter la croissance de plusieurs espèces de poissons. De ce fait, ces macroalgues ont gagné en popularité en tant que substituts partiels de FM, allant jusqu'à 20 % pour l'alimentation aquacole, car elles pourraient avoir des effets positifs sur l'absorption des nutriments, le métabolisme des lipides et la santé globale de plusieurs espèces telles que la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*), la carpe commune (*Cyprinus carpio*), le bar européen (*Dicentrarchus labrax*) et le mulot cabot (*Mugil cephalus*) (Tableau 1) (Wassef *et al.*, 2001 ; Güroy *et al.*, 2013 ; Shpigel *et al.*, 2017 ; Hodar *et al.*, 2020). Notamment, selon Pereira *et al.* (2012), des juvéniles *O. niloticus* digéraient mieux les protéines de l'algue *Ulva* produite en système AMTI (63 %) comparativement aux algues *Porphyra* (59 %) et *Gracilaria* (51 %).

Tableau 1. Articles ayant fait usage d'*Ulva* spp. comme substitut alimentaire chez différentes espèces de poissons et impact(s) sur leur performance en fonction du taux de protéines et de lipides (%) pour *Ulva* spp. et de la moulée comprenant l'*Ulva* spp. (%) (SGR = Taux de survie et de croissance, ND = non déterminé). Tableau adapté et modifié de Shpigel *et al.* (2017).

Espèce(s) de poisson	Remplacement effectué	Performance des poissons	Niveau de protéines et de lipides (%) de l' <i>Ulva</i>	Niveau de protéines et de lipides (%) de la moulée	Références
<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	<i>U. pertusa</i> a remplacé jusqu'à 15 % de FM	Aucune différence observée jusqu'à 10 % d' <i>Ulva</i>	ND	35 et 6,6 %	(Nakagawa, 1993)
<i>Paralichthys olivaceus</i>	ND	Taux de croissance a augmenté de 2 % avec <i>Ulva</i> sp.	ND	ND	(Xu <i>et al.</i> , 1993)
<i>Pagrus major</i>	<i>U. pertusa</i> a remplacé 5 % de FM	Aucune différence observée	ND	40 et 4,6 %	(Mustafa <i>et al.</i> , 1995)
<i>Sparus aurata</i> et <i>Dicentrarchus labrax</i>	ND	Différence observée sur la performance des deux espèces jusqu'à 10 % d' <i>Ulva</i>	17,4 et 2,5 %	ND	(Wassef <i>et al.</i> , 2005)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>U. rigida</i> a remplacé jusqu'à 10 % de la SBM	Aucune différence observée jusqu'à 10 % d' <i>Ulva</i>	29,5 et 1,4 %	30 et 14 %	(Valente <i>et al.</i> , 2006)

<b><i>Oreochromis niloticus</i></b>	<i>U. rigida</i> a remplacé jusqu'à 15 % de la FM	Aucune différence observée jusqu'à 10 % d' <i>Ulva</i>	8 et 0,15 %	40 et 5,4-7,7 %	(Güroy <i>et al.</i> , 2007)
<b><i>Cyprinus carpio</i></b>	<i>U. rigida</i> a remplacé l'amidon de blé	Augmentation du gain de poids et du SGR jusqu'à 5 % d' <i>Ulva</i>	8 et 0,15 %	40 et 8,2 %	(Diler <i>et al.</i> , 2007)
<b><i>Oreochromis niloticus</i></b>	<i>U. rigida</i> a remplacé jusqu'à 30 % de la SBM	Aucune différence observée dans le taux de croissance jusqu'à 20 % d' <i>Ulva</i>	16,41 et 2 %	28 et 7 %	(Azaza <i>et al.</i> , 2008)
<b><i>Oreochromis niloticus</i></b>	<i>U. rigida</i> a remplacé l'amidon de maïs	Augmentation du gain de poids et du SGR jusqu'à 5 % d' <i>Ulva</i>	9,9 et 0,11 %	40,5 et 10-20 %	(Ergün <i>et al.</i> , 2009)
<b><i>Oncorhynchus mykiss</i></b>	<i>U. lactuca</i> a remplacé jusqu'à 10 % de farine de blé	Diminution du taux de croissance et de l'utilisation de la nourriture	10 % et ND	45,5 et 9-11 %	(Yıldırım <i>et al.</i> , 2009)
<b><i>Oreochromis niloticus</i></b>	<i>Ulva</i> sp. a remplacé jusqu'à 25 % de farine et de son de blé	Augmentation du gain de poids et du SGR jusqu'à 15 % d' <i>Ulva</i>	ND	25 et 7,2 %	(El-Tawil, 2010)
<b><i>Oreochromis niloticus</i></b>	<i>Ulva</i> sp. provenant d'un AMTI a remplacé la FM jusqu'à 20 %	Aucune différence observée dans le taux de croissance jusqu'à 10 % d' <i>Ulva</i>	27 % et ND	34 et 2,6 %	(Marinho <i>et al.</i> , 2013)

<b><i>Oreochromis niloticus</i></b>	ND	Amélioration du taux de croissance jusqu'à 10 % <i>Ulva</i>	15 % et ND	32 % et ND	(Natify <i>et al.</i> , 2015)
<b><i>Oreochromis niloticus</i></b>	<i>Ulva</i> sp. provenant d'un AMTI a remplacé la FM jusqu'à 10 %	Aucun effet sur le taux de croissance jusqu'à 10 % <i>Ulva</i> sp.	26,7 et 2,7 %	35 et 7,5 %	(Silva <i>et al.</i> , 2015)
<b><i>Clarias gariepinus</i></b>	<i>U. lactuca</i> a remplacé jusqu'à 30 % de la FM	Aucune différence observée jusqu'à 10 % d' <i>Ulva</i> sp.	11,50 et 6,08 %	35,31 et 8,83 %	(Abdel-Warith <i>et al.</i> , 2016)
<b><i>Sparus aurata</i></b>	<i>U. lactuca</i> a remplacé jusqu'à 30 % de la FM	Aucune différence observée jusqu'à 14.6 % d' <i>Ulva</i> sp.	34 et 2,74 %	34 et 9 %	(Shpigel <i>et al.</i> , 2017)
<b><i>Dicentrarchus labrax et Sparus aurata</i></b>	Inclusion <i>Ulva ohnoi</i> jusqu'à 10 %	Aucune différence sur la digestibilité des protéines	ND	50,8 et 14 %	(Martínez-Antequera <i>et al.</i> , 2021)

Les macroalgues vertes, telles que *Ulva spp.*, sont une alternative marine intéressante, car elles ont une large distribution géographique, un taux de croissance rapide, une tolérance environnementale élevée, et une absorption élevée des nutriments d'un milieu donné (Moreira *et al.*, 2022). La nature opportuniste d'*Ulva spp.* et sa croissance importante dans de nombreuses niches écologiques en font une candidate idéale peu coûteuse (Shpigel *et al.*, 2017). En termes de valeur nutritive, les *Ulva spp.* sont une excellente source de vitamines, de minéraux, de pigments (caroténoïdes), de fibres solubles et de protéines (jusqu'à 32 %) (Abdel-Warith *et al.*, 2016 ; Laramore *et al.*, 2018). De plus, les Ulves produites par l'AMTI ont généralement une productivité plus élevée et des teneurs en protéines et en lipides plus stables (respectivement 26-37 % et 2-2,75 %), par rapport à celles cultivées à l'état sauvage (respectivement 8-16 % et 0,11-1,4 %), car elles ont un apport continu en nutriments *via* les rejets de fèces des poissons (Marinho *et al.*, 2013 ; Silva *et al.*, 2015 ; Shpigel *et al.*, 2017 ; Laramore *et al.*, 2022). Elles ont également une teneur importante en AGE (ex. oméga 3), qui peuvent représenter jusqu'à 66 % des lipides totaux, mais non suffisante pour une substitution complète de la FM et de la FO (Wahbeh, 1997 ; Silva *et al.*, 2015 ; Gaillard *et al.*, 2017). Cependant, les algues *Ulva spp.* ont une faible valeur commerciale sur le marché actuel donc leur vente n'est pas économiquement viable (Marinho *et al.*, 2013). Pour inciter l'intégration et l'application importante de systèmes AMTI à l'échelle globale, il semble donc pertinent d'ajouter la biomasse produite d'algues dans les moulées aquacoles d'organismes aquatiques (Marinho *et al.*, 2013).

La majorité des études utilisant *Ulva spp.* comme substitut partiel de FM et de FO ont été effectués sur des espèces de poissons d'eau douce herbivores et omnivores (Tableau 1), donc davantage d'études sont nécessaires pour les espèces de poissons marins carnivores comme le Pompano (Shpigel *et al.*, 2017). Notamment, les études se comportent principalement sur la croissance des juvéniles pour maximiser le rendement de la production aquacole plutôt que sur les géniteurs et leur efficacité reproductive. L'identification précise des besoins nutritionnels de l'espèce pour favoriser la maturation des gamètes est essentielle pour le conditionnement durable des géniteurs avec une moulée facile à digérer, peu coûteuse et à faible impact écologique (Gothreaux, 2008 ; Taynor, 2013).



Puisque l'un des principaux défis de la production commerciale de poissons marins est la production stable et constante de juvéniles de haute qualité, il est essentiel de respecter les besoins nutritionnels des géniteurs, notamment en termes d'AGE, afin de préserver la qualité des œufs et le succès du développement larvaire en aquaculture (Glencross, 2009 ; Mejri, 2016). Le remplacement de cette protéine animale par une option végétale marine plus abordable et plus durable devrait permettre de réduire les coûts associés à la production de poisson et d'accroître l'acceptabilité environnementale et sociale (Shpigel *et al.*, 2017).

## **5. OBJECTIF DU MÉMOIRE ET HYPOTHÈSE**

L'objectif principal était de déterminer l'effet d'une moulée expérimentale dont 10 % de farine de poisson fût substitué par la macroalgue *Ulva lactuca*, provenant d'un système AMTI du HBOI-FAU, dans l'alimentation des géniteurs Pompano de Floride et d'évaluer son impact sur le rendement reproductif de l'espèce en termes de qualité des œufs et de succès de développement des premiers stades de développement larvaire. Plus spécifiquement, l'effet de la moulée contenant de l'*Ulva* a été comparé à deux régimes généralement utilisés en pisciculture, soit à une moulée commerciale non spécifique Breed-M (INVE Aquaculture, Salt Lake City, UT) et à une alimentation inerte représentative de l'alimentation naturelle composée de krills et de crevettes, sur la qualité des œufs (c.-à-d. le taux de fécondation, le taux d'éclosion, la composition en acides gras, etc.) et des larves (taux de croissance, taille et utilisation du sac vitellin et de la gouttelette d'huile).

L'hypothèse testée était qu'une moulée dont la farine de poisson a été partiellement remplacé par l'*Ulva* fournirait des teneurs en nutriments suffisante pour produire des œufs de qualité à la base d'un bon développement larvaire, ce qui se refléterait par des rendements de production d'œufs et de larves similaires ou supérieurs aux autres régimes alimentaires testés.

Les résultats obtenus permettront de mieux comprendre les besoins nutritionnels des géniteurs Pompano afin de contribuer à un approvisionnement fiable de stocks de larves et

de juvéniles de qualité. L'un des traitements alimentaires s'inscrit dans l'économie circulaire en rendant l'alimentation plus durable grâce à la réduction FM et FO en remplaçant celles-ci par les sous-produits du système AMTI (*Ulva lactuca*). Ce projet jettera les bases d'une approche de production circulaire pour un système AMTI afin de réduire les intrants provenant d'animaux dans les moules aquacoles.



## CHAPITRE 1

# FISH MEAL SUBSTITUTION WITH IMTA-SOURCED *ULVA LACTUCA* ON FLORIDA POMPANO (*TRACHINOTUS CAROLINUS*) EGG QUALITY AND THEIR IMPACT ON EARLY LARVAL DEVELOPMENT

### ABSTRACT

Fish meal is commonly used in commercial feeds of carnivorous fish and is an expensive ingredient with variable nutritional composition and limited availability. Its partial replacement by an algal protein would reduce the costs associated with fish production and improve the industry's sustainability. The objective of this project was to compare commonly used broodstock feeds with an experimental diet in which 10 % of the fishmeal was substituted with the macroalgae *Ulva lactuca*, from an Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) system, on the reproductive performance and quality of the offspring of Florida pompano broodstock (*Trachinotus carolinus*). The different feeds were each tested for 8 weeks, successively, on the same group of 40 broodstock, starting with the control diet (shrimp and krill), followed by a commercial gel diet (Breed-M), and finally a pelleted feed with 10% *Ulva* replacement. After each spawning event, the fatty acid composition and the eggs, and larvae metrics such as (1) eggs per ml, (2) egg diameter and (3) oil droplet, (4) fertilization and (5) hatching rate, (6) newly hatched larvae length, (7) yolk sac, and (8) oil droplet were measured. Our results found that hatch rates and egg diameter were greater in fish fed the *Ulva* diet while the oil droplet was larger for the control treatment. In terms of fatty acid profile, eggs produced while on the *Ulva* diet had higher n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA), specifically docosahexaenoic acid (C22:6n3; DHA), with consistently higher DHA/EPA ratios and fatty acid content compared to other diets. Overall, the results, regarding morphological measurements or fatty acid profiles, suggest that the offspring obtained by females fed with *Ulva* feed would be of similar or even superior quality to other experimental feeds. The macroalgae *Ulva lactuca* can therefore be integrated into the Florida pompano aquaculture feed by up to 10 % with promising effects on reproductive performance while reducing the price of fish production and utilizing the by-products of an IMTA system.

Keywords: *Trachinotus carolinus*, partial replacement, fish meal, *Ulva lactuca*, egg quality, larval performance, essential fatty acids, IMTA

## 1.1 INTRODUCTION

Marine finfish aquaculture relies mainly on protein-rich commercial feeds, incorporating fish meal (FM) and fish oils (FO) (Lech and Reigh, 2012). However, with a growing human population and a stagnant global fishery, the use of forage fish from these commercial fisheries to feed aquaculture species is contested, as it raises major environmental, economic, and ethical issues (FAO, 2020). FM and FO are essential in formulated feeds, as they represent the primary source of proteins and lipids, especially those designed for carnivorous marine fish species, that require energy-dense diets enriched in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Kissinger *et al.*, 2016). Fish meal, rich in animal proteins, is optimal because of its high nutritional value as well as its palatability for farmed fish, although it can be the most expensive ingredient in aquafeeds (Lech and Reigh, 2012; Naylor *et al.*, 2021). Fish oil is the basic source of PUFAs of 20 carbons or more, such as docosahexaenoic acids (DHA), eicosapentaenoic acids (EPA), and arachidonic acids (ARA), which are considered essential fatty acids (EFA) for the survival and development of fishes (Glencross, 2009). Prices for FM and FO have more than doubled since 2012 and remained significantly higher than terrestrial plant alternatives due to the growing demand for fisheries stock and the fluctuating availability throughout the seasons (Shpigel *et al.*, 2017; Naylor *et al.*, 2021). Research has clearly demonstrated that most marine animals have a limited capacity to biosynthesize EFAs and consequently need to obtain these nutrients from their diet. Terrestrial alternatives such as palm and soybean oils are unsuitable for many marine species that have high and specific EFAs requirements, especially during broodstock conditioning and for successful larval development (Turchini *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2022). These terrestrial plant oils are rich in 18-carbon polyunsaturated fatty acids (18C-PUFA), but their incorporation in marine fish feed is restricted due to the limited biosynthesis capacity of marine fish to transform these 18C-PUFAs to DHA, EPA, and ARA (Glencross, 2009).

As one of the main challenges for commercial marine finfish production is having consistent and high-quality juveniles, it is, therefore, essential to satisfy the nutritional needs of broodstock, especially in terms of EFAs (Glencross, 2009; Mejri, 2016). Maternal diet

directly influences egg quality and larval performance during endogenous feeding (Izquierdo *et al.*, 2001), emphasizing the importance of providing broodstock with high-energy, and quality feed. This issue has pressured the industry to find dietary substitutes with equivalent nutritional composition to FM and FO (Shpigel *et al.*, 2017; Mejri *et al.*, 2019). Replacing these animal proteins and lipids with a more affordable and sustainable marine plant option can decrease fish production costs and increase environmental and social acceptability (Shpigel *et al.*, 2017). Macroalgae meals have gained popularity as partial substitutes (up to 10-20 % of FM) in aquafeeds, as they could provide positive effects on nutrient utilization, lipid metabolism, and physiological activities of numerous fish species such as the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), common carp (*Cyprinus carpio*), and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) (Güroy *et al.*, 2013; Shpigel *et al.*, 2017; Hodar *et al.*, 2020). Green macroalgae, such as the *Ulva* spp., is a suitable marine plant alternative as it has a wide geographical distribution, a fast growth rate, as well as a high environmental tolerance, and high nutrient uptake (Moreira *et al.*, 2022). In terms of nutritional value, *Ulva* spp. are excellent sources of vitamins, minerals, pigments (carotenoids), and proteins (Abdel-Warith *et al.*, 2016; Laramore *et al.*, 2018). They possess a significant content of EFAs but are not sufficient for a complete substitution of FM and FO (Gaillard *et al.*, 2017). Furthermore, most studies using *Ulva* spp. as a partial FM and FO substitute were performed on herbivorous and omnivorous freshwater fish species and little is known for carnivorous marine fish species (Shpigel *et al.*, 2017).

The important nitrogen absorption capacity of *Ulva* spp. is particularly relevant for their use in Integrated Multitrophic Aquaculture (IMTA) systems, with the removal of more than 80% of nitrogen compounds in the presence of aquatic animals (Marinho *et al.*, 2013; Laramore *et al.*, 2018). Additionally, IMTA-produced macroalgae, such as *Ulva* spp., commonly have higher productivity and more stable protein and lipid contents, compared to those grown in the wild, as they have a continuous nutrient supply (Marinho *et al.*, 2013). Thus, in this type of closed system, the discharge of water will optimize the production of algae biomass, which can then be developed as a supplement or dietary substitute for other aquaculture species (Marinho *et al.*, 2013).

The Florida pompano (*Trachinotus carolinus*) is a prime candidate for the tropical aquaculture industry as it is an economically important species with favorable traits, like high dockside prices, fast growth, and tolerance to a wide range of environmental conditions (i.e., salinity) (Gothreaux, 2008; Taynor, 2013; Bradshaw II *et al.*, 2023). However, more studies are needed on the species' nutritional needs to develop a more sustainable, and specialized maturation feed for brooders, with an easily digestible low-cost feed, with low ecological impact (Gothreaux, 2008; Taynor, 2013). The main aim of the present study was to investigate the effect of a feed with a 10 % FM substitution by an IMTA-sourced *Ulva lactuca* on the Florida pompano broodstock reproductive yield (egg quality and larvae performance). This experimental diet was compared with commonly used diets for domesticated species, such as a cut-bait diet (for this species, a mix of frozen shrimp and krill), and a commercial diet Breed-M (INVE Aquaculture, Salt Lake City, UT). This study hypothesizes that the egg quality and larval development of offspring obtained from broodstock fed the *Ulva* feed is similar or superior to the quality of offspring produced from the cut-bait and the commercial Breed-M diets. With the use of different diet treatments, the results aim to provide a greater understanding and insight into the nutritional dietary needs of Florida pompano broodstock to contribute towards a more reliable and steady supply of high-quality seed stock. This project will lay the groundwork for a circular production approach to an IMTA farm to reduce FM inputs in feeds.

## **1.2 MATERIAL AND METHODS**

### **1.2.1 Diet formulation**

The green macroalgae, *Ulva lactuca*, was freshly harvested from the IMTA outdoor raceways located at Florida Atlantic University's Harbor Branch Oceanographic Institute (HBOI-FAU) as described in Laramore *et al.* (2022). The biomass collected was sundried to remove excess water and then placed in a drying oven at 60°C for 24 h until completely dry and processed to a fine powder with a hammer mill to be used as the *Ulva* meal to substitute 10 % of FM in the *Ulva* diet. The other dietary ingredients of the *Ulva*

broodstock feed formulation were sourced from the United States Department of Agriculture (USDA) and described in Table 2.

Table 2. Formulation of the *Ulva* feed (in g/100g dry weight) fed to Florida pompano *T. carolinus* broodstock.

Ingredients	<i>Ulva</i> diet
	g/100g diet
<i>Ulva</i> meal	10.0
Menhaden meal <sup>a</sup>	25.9
Soybean meal <sup>a</sup>	19.5
Corn gluten meal <sup>a</sup>	8.0
Wheat gluten <sup>a</sup>	1.5
Blood meal, spray dried <sup>a</sup>	5.0
Shrimp meal <sup>a</sup>	5.0
Dextrin <sup>b</sup>	2.8
Wheat flour 70% starch 2 <sup>a</sup>	1.3
Menhaden oil <sup>c</sup>	6.8
Soybean oil <sup>d</sup>	7.4
Sipernat 50	1.0
Mineral premix <sup>a</sup>	1.5
Vitamin premix <sup>a</sup>	0.5
Lecithin <sup>e</sup>	0.1
Stay C-35 <sup>a</sup>	0.1
Carboxymethyl cellulose (CMC) <sup>f</sup>	2.0
$\alpha$ -Cellulose <sup>g</sup>	1.7
<b>Total</b>	<b>100.0</b>

<sup>a</sup> Obtained from Wendy Sealey from USDA

<sup>b</sup> WEBstaurant Store, LLC

<sup>c</sup> Aquatic Nutrition Inc.

<sup>d</sup> Happy Belly

<sup>e</sup> Thermo Scientific™

<sup>f</sup> MP Biomedicals

<sup>g</sup> Sigma Aldrich Fine Chemicals Biosciences

The ingredients for the *Ulva* feed were mixed with water in a food mixer (Hobart, USA) to produce an 8 mm pellet. The pellets were then dried in an oven at 60°C until no moisture remained (1-2 days) and stored in a -5°C freezer room until needed. The control diet consisted of cut bait comprised of a mix of thawed shrimp and krill that were locally sourced (McRoberts Sales Company, Ruskin, FL) while the commercial diet, formulated for



broodstock, was Breed-M (INVE Aquaculture, Salt Lake City, UT). To increase diet palatability, the pelleted *Ulva* feed and Breed-M diets were transformed into gel cubes with the use of 85 g of gelatin and 750 ml of hot water per 500 g of pellets with a high torque blender for mixing. The paste was then put in aluminum trays about ½”-3/4” deep and set for a minimum of 3 hours in the fridge. The gel diets were cubed with a pizza cutter and ration weighed into Ziploc bags and frozen until needed. The proximate composition (Table 3) of the broodstock diets (control, Breed-M, and *Ulva*) was analyzed by the University of Missouri Agricultural Experiment Station Chemical Laboratories (ESCL).

Table 3. Proximate analysis (W/W% of dry matter, mean ± SD) of the diets (control, Breed-M, and *Ulva* before gelation) fed to Florida Pompano (*T. carolinus*). W/W% = grams per 100g of sample. Crude protein = %N x 6.25.

Dietary component	Proximate analysis		
	Control n = 3	Breed-M n = 3	<i>Ulva</i> n = 3
Crude protein	82.2 ± 1.8	63.2 ± 0.4	41.1 ± 0.7
Moisture	4.2 ± 0.7	2.7 ± 0.8	7.8 ± 0.1
Crude fat	2.5 ± 0.4	14.2 ± 0.2	12.8 ± 0.4
Crude fiber	3.5 ± 0.4	0.4 ± 0.0	3.0 ± 0.1
Ash	7.6 ± 0.3	13.5 ± 0.2	13.7 ± 0.0

### 1.2.2 Fish and experimental design

A mix of wild-caught (Mote Marine Laboratory, Sarasota, FL, USA) and F1 generation brood fish (Proaquatix, Vero Beach, FL, USA), consisting of 18 males (1.09 ± 0.22 kg) and 22 females (2.07 ± 0.46 kg), were equally distributed, depending on availability, into four replicate tanks (Figure 10) of 2.5 m diameter and 7 m<sup>3</sup> volume. To encourage the feeding of the gel diets, F1 generation fish (25 %) were mixed with the wild fish population (75 %) due to insufficient F1 generation fish for this experiment. The tanks were set up in two identical recirculating aquaculture systems (RAS) and were located indoors in a maturation room on HBOI’s Aquaculture campus. The tank systems were equipped with a cartridge filter mechanical system, UV sterilization, bubble wash bead, overhead artificial

lighting with timer-controlled photoperiods, and a 5-ton heat exchanger. During the spawning season, the tanks were subjected to a 12-hour light and 12-hour dark photoperiod cycle and set at a constant temperature of 24 °C to encourage oocyte maturation.

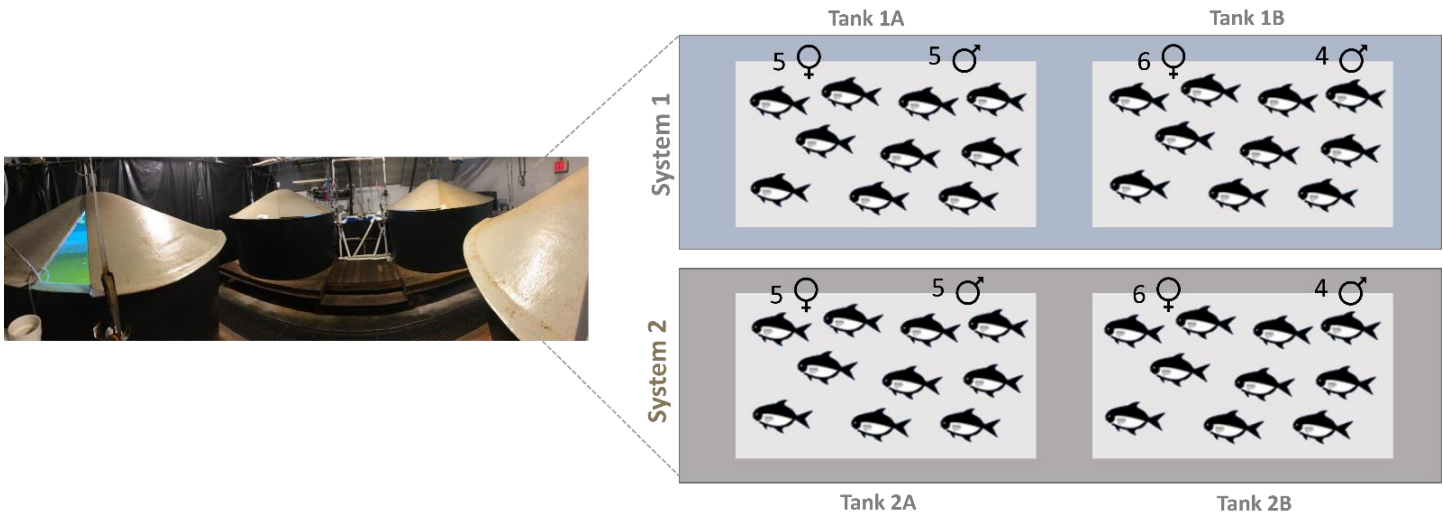


Figure 10. Experimental design consisting of 4 tanks (1A, 2A, 1B, and 2B) in 2 Identical Recirculating Aquaculture Systems (RAS) with a similar number of males and females in each tank.

Broodstock was fed the diet treatment 4 times a day at 10 % body weight for 8 weeks. Following a period of conditioning, the experiment was repeated 3 times successively with the cut-bait (CB), Breed-M (BM), and *Ulva* (UM) diets.

### 1.2.3 Broodstock spawning and sampling

After each diet treatment, spawning was induced as described in Weirich *et al.* (2021). Briefly, environmental parameters were of the following range: temperature (27-29°C), salinity (26-35 ppt), pH (7.0-8.0), and dissolved oxygen (D.O., >120 %). In each tank, fertilized eggs were collected and placed in a 725 L incubator until hatching (~24 hours). Larval rearing protocol was based on Wills *et al.* (2023), where larvae were fed non-enriched S-type rotifers (*Brachionus rotundiformes*), followed by enriched rotifers, *Artemia*, enriched *Artemia*, and dry micropellets Otohime B1, B2, C1 and C2 (Reed Mariculture, Campbell,

CA). The proximate composition for all larval diets was analyzed (Table 4). Egg and larvae samples were collected twice a day during the endogenous period (first 3 days post-fertilization) and once a day during the exogenous period until 20 days post-fertilization). These samples were collected for biometry measures, consisting of total eggs per ml, fertilization rate, hatch rates, and egg diameter, as a proxy for egg quality, as well as oil droplet diameter, yolk sac length, and larvae length, as a larval performance proxy. Egg and larvae measurements were made with a stereoscope Olympus SZX7 using CellSens software (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japan). All biochemical samples were frozen at -80°C for storage.

Table 4. Proximate analysis (W/W% of dry matter, mean  $\pm$  SD) of the diets fed to Florida Pompano (*T. carolinus*) larvae and juveniles during live-prey (non-enriched rotifers, enriched rotifers, *Artemia*, and enriched *Artemia*) and weaning (Otohime B1, B2, C1 and C2) stages. W/W% = grams per 100g of sample. Crude protein = %N x 6.25

	Proximate analysis							
	Non-enriched rotifer n = 3	Enriched rotifer n = 3	<i>Artemia</i> newly hatched n = 3	Enriched <i>Artemia</i> n = 1	Otohime B1 n = 3	Otohime B2 n = 3	Otohime C1 n = 3	Otohime C2 n = 3
<b>Crude protein</b>	56.5 $\pm$ 0.6	52.9 $\pm$ 0.2	53.2 $\pm$ 2.8	48.8	61.9 $\pm$ 1.8	60.7 $\pm$ 2.1	60.2 $\pm$ 2.4	60.5 $\pm$ 3.2
<b>Moisture</b>	2.2 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.5	4.0	1.0 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.0
<b>Crude fat</b>	5.9 $\pm$ 0.6	10.5 $\pm$ 0.8	9.2 $\pm$ 3.7	12.8	15.5 $\pm$ 0.4	16.4 $\pm$ 0.6	17.4 $\pm$ 0.4	16.4 $\pm$ 0.4
<b>Crude fiber</b>	2.1 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.3	5.5 $\pm$ 1.5	3.7	2.1 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.2
<b>Ash</b>	20.7 $\pm$ 2.7	18.5 $\pm$ 1.2	16.0 $\pm$ 4.3	23.2	12.8 $\pm$ 0.0	12.7 $\pm$ 0.1	14.1 $\pm$ 0.1	14.4 $\pm$ 0.1

#### 1.2.4 Chemical analysis

Fatty acids from the egg, larvae, and diet samples were extracted using the slightly modified Folch *et al.* (1957) method described in Parrish (1999), then methylated using Lepage and Roy (1984) method to produce fatty acid methyl esters (FAMES). Following the addition of a 19:0 standard in each sample, these FAMES were analyzed by a gas chromatography-mass spectrometry Clarus 680/600 T GC-MS (Perkin-Elmer, Waltham, Mass., USA) using a 15-m Supelco Omegawax column with a 250- $\mu$ m diameter. Samples were individually injected into the column, using an 82-vial autosampler with a 61.5/1 split ratio, at a volume of 1.0  $\mu$ L. Those samples were then placed in the oven where the temperature was held for 2 min from 120 to 180 °C at a rate of 15 °C per minute, followed by a temperature of 250 °C at a rate of 10 °C per minute. Hydrogen was used as a carrier gas with a flow rate of 0.8 mL per minute with GC inlets kept at a fixed temperature of 250 °C. Analyses from the Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) were conducted with a 70eV electron impact (EI) and the data was acquired through a full scan mode of the m/z range of 45-600 (selected ion monitoring). The identification of the FAs was determined with molecular weight, different FAs detected were compared with a 37-component FAME standard (Supelco 37 FAME Mix, Millipore Sigma, Burlington, Mass., USA), and the internal standard peak area was determined using the ratio of 19:0.

#### 1.2.5 Statistical analysis

Each morphometric data (final length of the oil droplet, yolk sac length and larval length) was compared at the last shared date among all diets by a one-way univariate permutational analysis of variance (PERMANOVA) using unrestricted permutations ( $n = 999$ ) of raw data with the diet type as a factor. General characteristics of egg and larvae (number of eggs, egg and oil droplet diameters, fertilization and hatching rates, and newly hatched larvae length) were also compared between each diet using one-way univariate PERMANOVAs or a *t*-test using XLSTAT v19.1 software (Addinsoft, Paris, France) when the sample size was  $n < 3$ . Multivariate PERMANOVAs were also used on the fatty acid

composition of larvae of different ontogenic stages (embryonic, mouth-opening, live-prey, and weaning) to discriminate differences obtained among diets. A distance-based redundancy analysis (dbRDA) was realized using a similarity matrix (Bray-Curtis) to comprehend the correlation between the diet treatments, ontogenic stages, and fatty acid compositions. To identify the specific fatty acids explaining the most important differences observed, similarity percentages (SIMPER) analyses were performed. All analyses were applied using the software Primer V7.0.21 (Primer-e, Quest Research Limited).

### 1.3 RESULTS

#### 1.3.1 Fatty acid composition of broodstock diets

The fatty acid composition of the three diet treatments (control, Breed-M, and *Ulva*) were different (Pseudo- $F_{2,8} = 230.56$ ,  $p = 0.005$ ; Table 5), as identified by posteriori pair-wise tests with  $p$ -values  $< 0.05$  for each comparison. The control and Breed-M diets' fatty acid profiles were up to 32 % different from one another with more than 50 % of this difference explained by DHA, EPA, and 18:0, with contributions of 22, 20, and 11 % respectively. control and *Ulva* fatty acid composition showed 34 % dissimilarity where 59 % of this difference was explained by LA, EPA, and 16:1 with contributions of 27, 21, and 11 %, respectively. Finally, the fatty acid composition of *Ulva* was 35% dissimilar from the Breed-M diet where LA (33 %) and DHA (27 %) contributed towards 60 % of this dissimilarity.

The control diet had high EPA, ARA, and 18:0 levels while the Breed-M diet contained more DHA and 22:1 and finally, the *Ulva* diet was characterized by higher levels of LA and LNA (Table 5). Furthermore, diets were different in terms of SFA (Pseudo- $F_{2,8} = 91.532$ ,  $p = 0.022$ ), MUFA (Pseudo- $F_{2,8} = 219.66$ ,  $p = 0.009$ ), PUFA (Pseudo- $F_{2,8} = 156.05$ ,  $p = 0.001$ ), and the mass of total fatty acids (MTFA, Pseudo- $F_{2,8} = 315.69$ ,  $p = 0.006$ ). The control diet had the highest SFA and PUFA proportions, but a 6 times lower concentration of total fatty acids, as reflected by the low-fat content in the cut-bait shrimp (Table 3). SFA, MUFA, and PUFA content were slightly different between the Breed-M and *Ulva* diets, but

the *Ulva* diet had 10 % more MTFAs (Table 5). The  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 (Pseudo- $F_{2,8} = 214.02$ ,  $p = 0.003$ ), EPA/ARA (Pseudo- $F_{2,8} = 51.514$ ,  $p = 0.007$ ) and DHA/EPA ratios (Pseudo- $F_{2,8} = 243.31$ ,  $p = 0.003$ ) were all different between diets with pair-wise tests nonsignificant ( $p > 0.05$ ) for every pair. The Breed-M had a 28 % higher  $\omega$ -3 to  $\omega$ -6 ratio as well as a DHA/EPA ratio 3 times higher than the *Ulva* diet (Table 5). However, the *Ulva* diet had a more important EPA/ARA ratio (22 % higher). The DHA/EPA ratio from the control diet was lower by more than 25 % compared to the Breed-M and *Ulva* diets while the EPA/ARA ratio was lower by more than 60 %. The  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 ratio of the *Ulva* feed ( $0.75 \pm 0.02$ ) was more than 60 % lower than the control diet and over 4 times lower than the Breed-M diet (Table 5).

Table 5. Fatty acid composition of the diet treatments (control, Breed-M, and *Ulva*) used to feed Florida pompano (*T. carolinus*) broodstock, presented as a percentage of total fatty acids (mean  $\pm$  SD). Also shown are the  $\omega$ -3/ $\omega$ -6, DHA/EPA, and EPA/ARA ratios as well as the mass of total fatty acid (MTFA; mg g<sup>-1</sup> dry mass) at the foot of the table, along with average similarity (SIMPER outputs) within each species group. The main fatty acids contributing >10% to the differences in each diet (SIMPER outputs) are indicated in bold. Fatty acids contributing to less than 1 % were removed but added to the total SFA, MUFA, and PUFA. SFA: saturated FA; MUFA: monounsaturated FA; LA: linoleic acid; LNA: linolenic acid; ARA: arachidonic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; PUFA: polyunsaturated FA.

Fatty acid	Diet		
	Control n =3	Breed-M n =3	<i>Ulva</i> n =3
14:0	0.38 $\pm$ 0.03	2.83 $\pm$ 0.27	2.88 $\pm$ 0.17
16:0	<b>12.75 <math>\pm</math> 0.39</b>	<b>12.20 <math>\pm</math> 0.93</b>	<b>11.19 <math>\pm</math> 0.51</b>
17:0	1.09 $\pm$ 0.06	0.48 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.03
18:0	<b>10.26 <math>\pm</math> 0.74</b>	3.07 $\pm$ 0.34	4.03 $\pm$ 0.46
$\Sigma$ SFA <sup>a</sup>	25.28 $\pm$ 0.60	19.39 $\pm$ 0.77	19.64 $\pm$ 0.08
16:1	1.50 $\pm$ 0.15	4.00 $\pm$ 0.13	8.82 $\pm$ 0.30
18:1n9 (Z)	8.98 $\pm$ 0.58	8.84 $\pm$ 0.35	<b>10.30 <math>\pm</math> 0.16</b>
18:1n9 (E)	1.36 $\pm$ 0.23	1.21 $\pm$ 0.18	1.33 $\pm$ 0.18
20:1	1.04 $\pm$ 0.24	6.09 $\pm$ 0.64	0.96 $\pm$ 0.29
22:1	0	6.09 $\pm$ 0.49	0

24:1	0.47 ± 0.03	1.16 ± 0.02	0.39 ± 0.01
Σ MUFA <sup>β</sup>	13.63 ± 0.90	27.77 ± 0.56	22.31 ± 0.29
18:2n6 (LA)	<b>13.12 ± 0.77</b>	9.01 ± 0.79	<b>31.62 ± 0.39</b>
18:3n3 (LNA)	1.13 ± 0.23	1.30 ± 0.16	4.78 ± 0.66
20:2	1.41 ± 0.12	0.29 ± 0.05	0.18 ± 0.01
20:4n6 (ARA)	6.45 ± 0.65	1.38 ± 0.13	0.95 ± 0.13
20:5n3 (EPA)	<b>26.60 ± 1.96</b>	<b>14.01 ± 0.40</b>	<b>12.31 ± 0.61</b>
22:6n3 (DHA)	<b>12.38 ± 0.41</b>	<b>26.60 ± 0.84</b>	7.74 ± 0.41
Σ PUFA <sup>δ</sup>	61.09 ± 0.89	52.84 ± 0.49	58.04 ± 0.22
ω-3/ω-6	2.06 ± 0.26	4.05 ± 0.33	0.75 ± 0.02
EPA/ARA	4.17 ± 0.71	10.25 ± 1.29	13.09 ± 1.20
DHA/EPA	0.47 ± 0.02	1.90 ± 0.11	0.63 ± 0.06
MTFA	24.48 ± 1.99	129.37 ± 10.65	145.81 ± 10.71
Average similarity (%)	95.65	96.26	97.20

α: includes 12:0, 13:0, 15:0, 17:0, 20: and 22:0, whose combined percentages are ≤ 2% of total fatty acids.

β: includes 17:1.

δ: includes 18:3n6, 20:3n6 and 20:3n3, whose combined percentages are ≤ 1% of total fatty acids.

### 1.3.2 General characteristics of egg and larvae

We observed differences in the initial oil droplet diameter, egg diameter, and the egg number produced from broodstock fed from the different diets (Table 6). No differences were found for any diet treatment for the fertilization and hatch rates and newly hatched larvae sizes. Due to technical problems, the hatch rate of eggs produced with the Breed-M diet as well as the newly hatched larvae length was not obtained.

Table 6. General characteristics of eggs and larvae (values in mean ± SD) following spawns from diet treatments (control, Breed-M, and *Ulva*) for Florida Pompano (*Trachinotus carolinus*) broodstock with the number of spawning females for each diet. The main test PERMANOVA results were done for the number of eggs and fertilization rate (control n = 3, Breed-M n = 6 and *Ulva* n = 5), egg and oil droplet diameter (n = 25 for all diets). The *t*-test



was done for the hatch rate (n=3 for all) and newly hatched larvae (32 hpf) length (control n = 14 and *Ulva* n = 16). Letters represent significant differences between diets.

	Diet			PERMANOVA results			
	Control 3 ♀	Breed-M 2 ♀	<i>Ulva</i> 3 ♀	Source of variation	df	Pseudo-f	P (perm)
Number of eggs per ml	1360.00 ± 190.71 <sup>ab</sup>	1570.33 ± 217.48 <sup>b</sup>	1292.20 ± 50.66 <sup>a</sup>	Diet	2	3.8622	0.041*
				Residual	11		
Egg diameter (µm)	966.47 ± 20.24 <sup>a</sup>	966.55 ± 26.10 <sup>a</sup>	995.36 ± 29.91 <sup>b</sup>	Diet	2	10.192	0.001**
				Residual	72		
Oil droplet diameter (µm)	280.22 ± 11.56 <sup>a</sup>	263.35 ± 12.66 <sup>b</sup>	267.31 ± 14.87 <sup>b</sup>	Diet	2	11.085	0.001**
				Residual	72		
Fertilization rate (%)	78.65 ± 4.08	79.77 ± 16.59	75.15 ± 4.48	Diet	2	0.18445	0.863
				Residual	11		
Hatch rate (%)	77.78 ± 21.47	-	93.72 ± 7.30	<i>t</i> -test		<i>t</i> value = 2.776	p-value = 0.290
Newly hatched larvae length (µm)	2800.31 ± 234.85	-	2845.88 ± 229.03	<i>t</i> -test		<i>t</i> value = 2.048	p-value = 0.595

Abbreviations: df = degrees of freedom.

\* Significant differences (p<0.05).

\*\*Significant differences (p < 0.01).

### 1.3.3 Larvae biometrics

#### 1.3.3.1 Oil droplet use

The oil droplet was significantly different between the larvae aged between 60 and 61 hpf from the different broodstock diet treatments (Pseudo- $F_{2,64} = 67.318$  and  $p = 0.001$ ). The oil droplet of larvae differed between breeders fed the *Ulva* and Breed-M diets ( $p = 0.001$ ) as well as the *Ulva* and control diets ( $p = 0.001$ ). In contrast, the comparison concerning the Breed-M and control diets was not statistically different ( $p = 0.761$ ). The oil droplet of larvae from *Ulva* diet was generally smaller, with values ranging from 70 to 270 µm, and used more rapidly than larvae from the control diet, as demonstrated by the regression equation (Figure 11). Finally, the

larvae produced from the Breed-M-fed broodstock had the highest oil diameter values (with a maximum of 315  $\mu\text{m}$ ), but the more rapid degradation from all treatments, with the absence of oil droplets after 86 hpf, compared respectively to 110 and 116 hpf for the larvae obtained from genitors fed the control and *Ulva* diets.

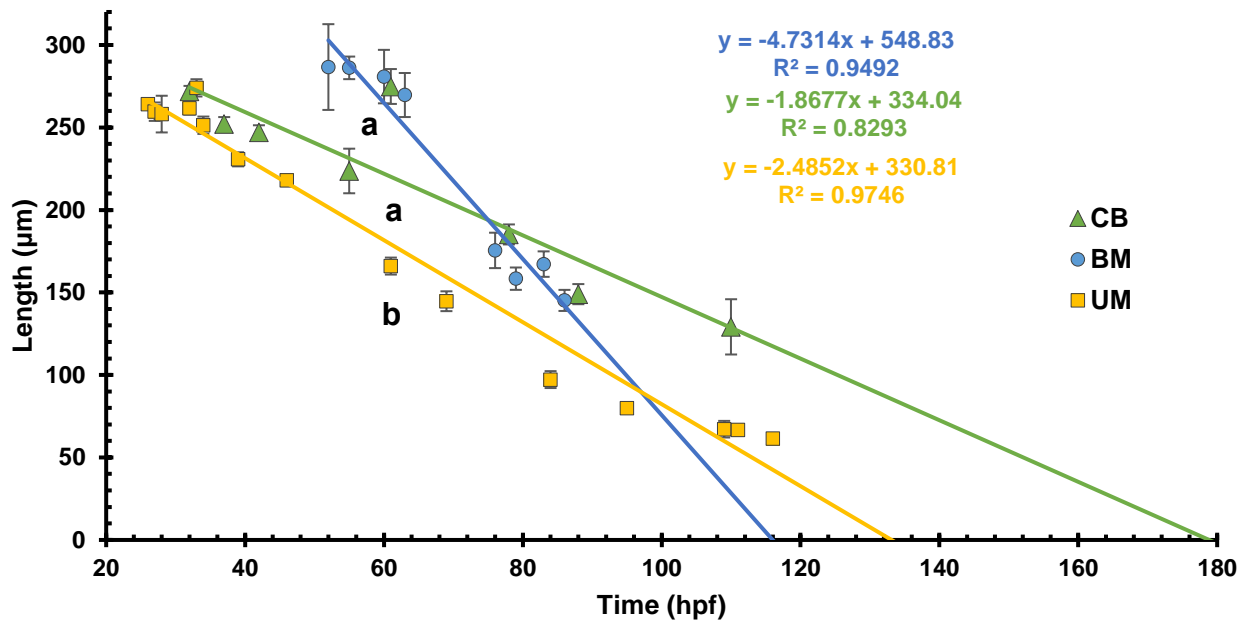


Figure 11. Size of the oil droplet (in  $\mu\text{m}$ ) according to time in hours post fertilization (hpf) for larvae obtained from broodstock fed on control ( $\blacktriangle$ ), Breed-M ( $\bullet$ ), and *Ulva* ( $\blacksquare$ ) diets. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  SE.

### 1.3.3.2 Yolk sac length

Differences in the yolk sac length from larvae from all diets were observed (Pseudo- $F_{2,56} = 82.289$ ,  $p = 0.001$ ), specifically between *Ulva* and control, as well as Breed-M and control ( $p = 0.001$  for both comparisons). No differences were found for the yolk sac length of larvae coming from broodstock fed *Ulva* and Breed-M ( $p = 0.388$ ). Newly hatched larvae (around 30 hpf), had the longest yolk sac (around 950  $\mu\text{m}$ ) in the control treatment, followed by the larvae from *Ulva* with a mean value of 850  $\mu\text{m}$  around 40 hpf (Figure 12). Data was not available for the yolk sac length of larvae from Breed-M treatment between 30 and 50 hpf. The yolk sac from larvae of control was larger and used more slowly than in larvae from other diet treatments. The

yolk diameter of larvae from *Ulva* diet-fed broodstock had the most significant decrease from 40 to 45 hpf.

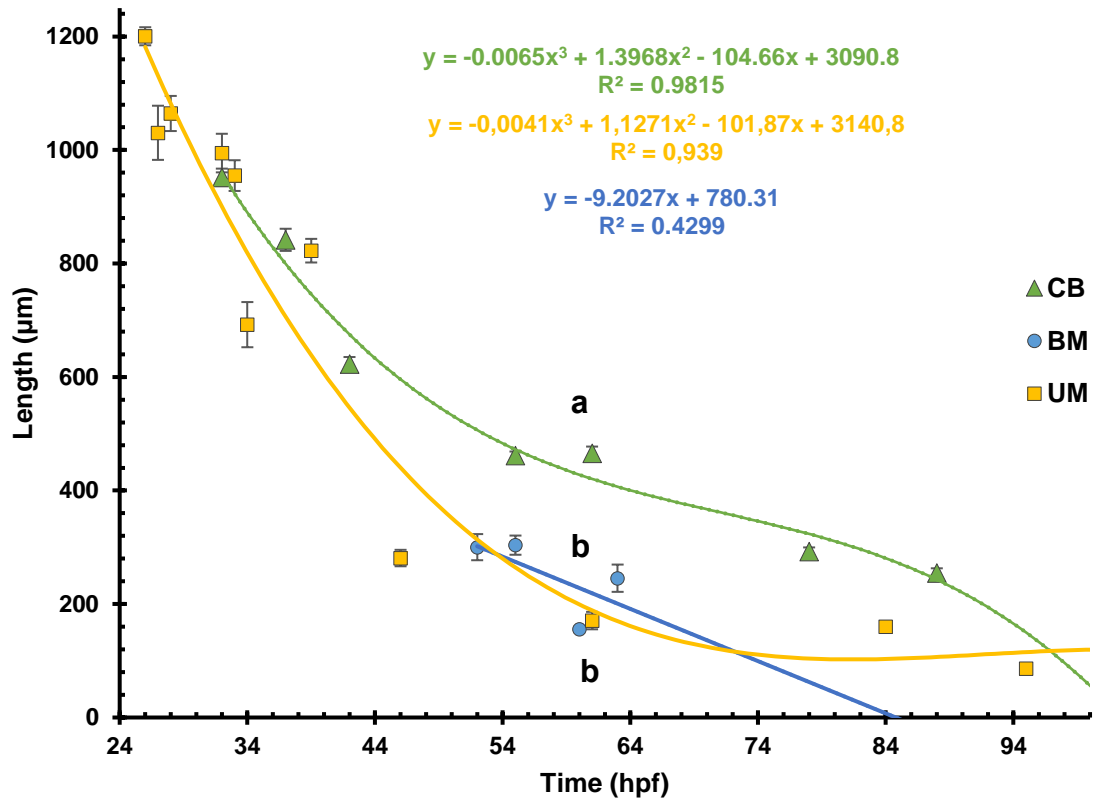


Figure 12. Length of the yolk sac (in  $\mu\text{m}$ ) according to time in hours post fertilization (hpf) for larvae from control ( $\blacktriangle$ ), Breed-M ( $\bullet$ ) and *Ulva* ( $\blacksquare$ ) diets. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  SE.

### 1.3.3.3 Larvae length

Larval growth from progeny produced by broodstock fed the three diets exhibited similar exponential patterns yet differed among diets at around 320 hpf (Pseudo- $F_{2,34} = 8.4046$ ,  $p = 0.001$ ). Lower length values of 6500  $\mu\text{m}$  were obtained only in larvae from the control diet, compared to respectively 8000 and 9000  $\mu\text{m}$  in larvae produced by breeders fed Breed-M and *Ulva* diets (Figure 13).

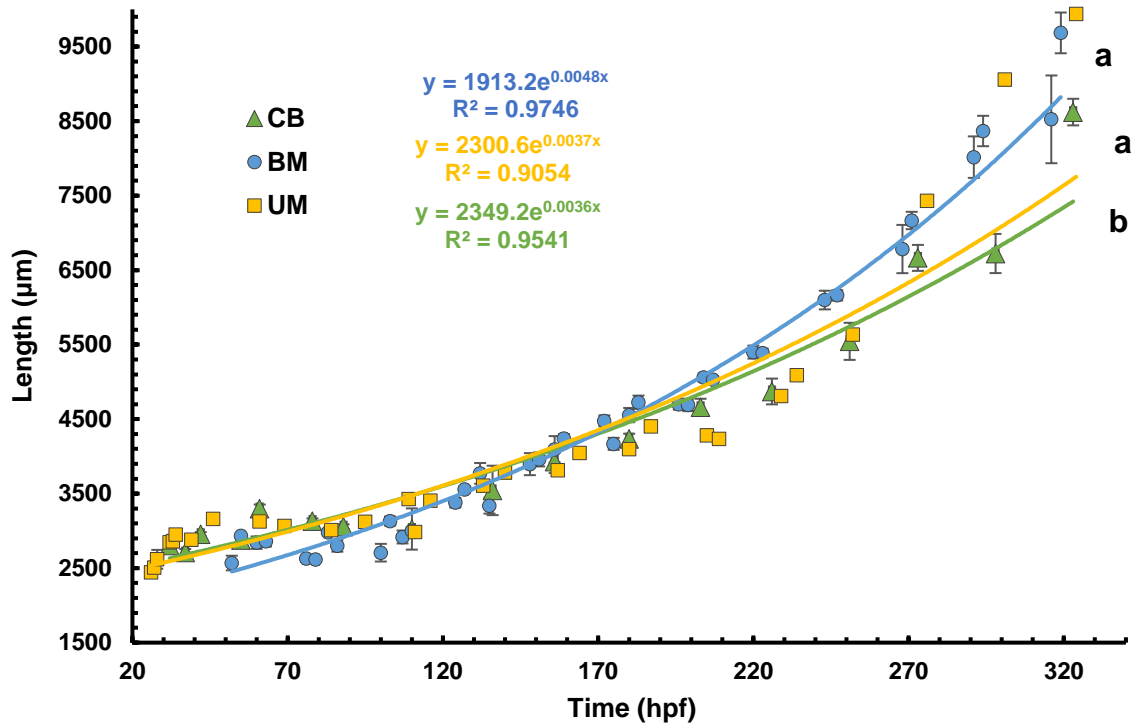


Figure 13. Length (in  $\mu\text{m}$ ) of larvae according to time in hours post fertilization (hpf) from control ( $\blacktriangle$ ), Breed-M ( $\bullet$ ) and *Ulva* ( $\blacksquare$ ) diets. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  SE.

### 1.3.4 Fatty acid composition of offspring between diet treatments and time

Larvae from each diet treatment were grouped according to DPH (days post-hatch). The fatty acid composition during ontogeny showed an interaction effect between the diet and time (in DPH) (Pseudo- $F_{13,85} = 5.7553$ ,  $p = 0.001$ ) and differences among DPHs within each diet treatment (Table 7). Eggs and larvae obtained from broodstock fed the experimental diets exhibited distinct fatty acid compositions until 3 DPH, except the FA profile of 1 DPH larvae which differed between progeny obtained from broodstock fed the Breed-M and the control diets. After 3 DPH, differences disappeared until the end of the experiment after weaning (19 DPH).

Table 7. PERMANOVA main test for the FA composition of larvae according to diet (CB, BM, ULVA) and time of development. The main test shows df, Pseudo-F, and P(perm) for different sources of variation (Diet, Time, and Diet X Time), and pair-wise tests were done for Diet X Time for pairs of levels of factor “Diet” with p-value presented.

<b>Main test</b>			
<b>Source of variation</b>	<b>df</b>	<b>Pseudo-F</b>	<b>P (perm)</b>
<b>Diet</b>	2	48.833	0.001**
<b>Time</b>	7	58.154	0.001**
<b>Diet X Time</b>	13	5.7553	0.001**
<b>Residual</b>	63		
<b>Total</b>	85		
<b>Pair-wise test</b>		<b>p-value</b>	
<b>Time</b>	<b>BM + CB</b>	<b>BM + ULVA</b>	<b>CB + ULVA</b>
<b>Egg (0 DPH)</b>	0.023*	0.033*	0.037*
<b>1 DPH</b>	0.002**	0.19	0.059
<b>2 DPH</b>	0.004**	0.004**	0.02*
<b>3 DPH</b>	0.002**	0.004**	0.002**
<b>9 DPH</b>	0.346	0.07	0.071
<b>13 DPH</b>	0.327	0.339	0.359
<b>15 DPH</b>	-	0.323	-
<b>19 DPH</b>	0.069	0.361	0.071

Abbreviations: df = degrees of freedom.

\* Significant differences (p<0.05).

\*\*Significant differences (p < 0.01).

Differences in larval FA proportions among diets were mainly attributable to 5 fatty acids: 16:0, DHA, 20:1, 18:1n9, and LA. The highest dissimilarity of 23 % was found between the *Ulva* and control diets with DHA, 16:0 and 18:1n9 being the highest contributors to the differences (over 47 %) (Table 8). A 20 % dissimilarity was observed between the fatty acid composition of larvae produced by broodstock fed the Breed-M and control diets with 16:0, 18:1n9, 20:1, and DHA explaining over 50 % of the differences. Breed-M and *Ulva* larvae had 14 % differences in their fatty acid profile with DHA, LA, 16:0, 18:0, and 18:1n9(Z) explaining 70 % of differences. The fatty acid groups and ratios SFA, PUFA, DHA/EPA, and MTFAs showed variations between diets, whereas MUFA was similar for larvae from all diet treatments. The EPA/ARA ratio exhibited similarity between larvae obtained from the Breed-M and control diets, while the  $\omega$ 3/ $\omega$ 6 ratio showed a resemblance

between the Breed-M and *Ulva* diets.

Table 8. Similarity percentage analysis (SIMPER) for each diet comparison (**BM** for Breed- M, **CB** for Control, and **UM** for *Ulva* diet) with ontogenic stages grouped. SIMPER provided average dissimilarity (%) and the top 70 % contributing fatty acids. Pair-wise tests were done for each fatty acid group, ratios, and the mass of total fatty acid (MTFA) with the p-value indicating whether it is significant between diet treatments, with the Pseudo-f and p-value shown for the interaction effect between the ontogenic stage and diet except the MTFA. SFA: saturated FA; MUFA: monounsaturated FA; PUFA: polyunsaturated FA; DHA: docosahexaenoic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; ARA: arachidonic acid.

<b>SIMPER</b>	<b>BM + CB</b>	<b>BM + ULVA</b>	<b>CB + ULVA</b>
Average dissimilarity (%)	19.61	14.26	22.96
Contributing fatty acids (top 70%)	16:0 18:1n9 (Z) 20:1 22:6n3 20:5n3 18:2n6 (LA) 18:0	22:6n3 18:2n6 (LA) 16:0 18:0 18:1n9 (Z)	22:6n3 16:0 18:1n9 (Z) 18:2n6 (LA) 20:1 20:5n3
Pair-wise test	p-value		
Fatty acid groups, ratios, and total mass	<b>BM + CB</b>	<b>BM + ULVA</b>	<b>CB + ULVA</b>
<b>SFA</b> Pseudo-F <sub>8,59</sub> = 11.366, p = 0.001	0.001**	0.001**	0.001**
<b>MUFA</b> Pseudo-F <sub>8,59</sub> = 5.3612, p = 0.001	0.061	0.098	0.285
<b>PUFA</b> Pseudo-F <sub>8,59</sub> = 4.6505, p = 0.001	0.006**	0.001**	0.001**
<b>ω3/ω</b> Pseudo-F <sub>8,57</sub> = 10.243, p = 0.001	0.001**	0.214	0.001**
<b>DHA/EPA</b> Pseudo-F <sub>8,57</sub> = 17.903, p = 0.001	0.001**	0.002**	0.001**
<b>EPA/ARA</b> Pseudo-F <sub>8,57</sub> = 6.4379, p = 0.002	0.317	0.001**	0.002**
<b>MTFA</b> Diet = Pseudo-F <sub>2,57</sub> = 37.823, p = 0.001 ; Stage = Pseudo-F <sub>4,57</sub> = 4.1776, p = 0.004	0.001**	0.003**	0.001**

During the embryonic stage and upon hatching, distinctions were observed between the Breed-M and ULVA treatments regarding saturated fatty acids (SFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA). Upon reaching the mouth-opening stage, larvae from each dietary treatment exhibited discernible differences in SFA and PUFA profiles. However, no variations were noted beyond this developmental milestone among the treatments (Table 9).

Table 9. Pair-wise tests were done for SFA, MUFA, and PUFA groups between diet treatments (**BM** = Breed-M; **CB** = control) for each ontogenic stage (**A** = egg; **B** = newly hatched; **C** = mouth-opening; **D** = live-prey; **E** = weaning) with the p-value indicating whether it is significant between diet treatments. SFA: saturated FA; MUFA: monounsaturated FA; PUFA: polyunsaturated FA.

Pair-wise test	p-value								
	<b>BM + CB</b>			<b>BM + ULVA</b>			<b>CB + ULVA</b>		
Ontogenic stage	SFA	MUFA	PUFA	SFA	MUFA	PUFA	SFA	MUFA	PUFA
A	0.063	0.141	0.204	0.027*	0.257	0.025*	0.508	0.086	0.078
B	0.869	0.324	0.193	0.019*	0.693	0.037*	0.078	0.478	0.056
C	0.004**	0.459	0.026*	0.003**	0.543	0.02*	0.004**	0.983	0.005**
D	0.357	0.332	0.347	0.862	0.336	0.394	0.067	0.077	0.141
E	0.077	0.063	0.075	0.65	0.32	0.329	0.067	0.131	0.07

Between ontogenic stages, the highest dissimilarity was found between the eggs and larvae fed with live prey (35 %), with 18:3n3, DHA, and 16:0 explaining 55 % of the differences (Table 10). The lowest dissimilarity was observed between eggs and newly hatched larvae (11 %) with over 50 % differences caused by 16:0, 18:1n9(Z), and DHA. Lower dissimilarity values were found among the first three stages (e.g., egg, newly hatched larvae, and mouth-opening larvae), with greater variations emerging when compared to the later stages (live-prey and weaning) with 18:3n3 and DHA being the main FAs. The proportion of SFA (Pseudo- $F_{8,59} = 11.366$ ,  $p = 0.001$ ), MUFA (Pseudo- $F_{8,59} = 5.3612$ ,  $p = 0.001$ ), and PUFA (Pseudo- $F_{8,59} = 4.6505$ ,  $p = 0.001$ ) in larvae showed significant interaction between diet treatment and ontogenic stage. Total fatty acids (MTFA) content showed no interaction effect between the diet and the ontogenic stages, but an effect of diets and an effect of ontogenic stages were observed. The Breed-M progeny exhibited the greatest variations between ontogenic stages for FA groups including SFA, MUFA, PUFA, and MTFA, followed by the control progeny. These variations were most pronounced between the initial stages (embryonic, newly hatched larvae, and mouth-opening) as well as between newly hatched larvae and later stages (mouth-opening, live-prey, and weaning stages). Progeny obtained from females fed the *Ulva* diet had fewer differences in the FAs groups between stages with only SFA and MTFA having variations between the egg stage and feeding larvae, and between mouth-opening and live-prey larvae.



Table 10. Similarity percentage analysis (SIMPER) for each diet treatment (**BM** for Breed-M, **CB** for Control, and **UM** for *Ulva* diet) and for SFA, MUFA, PUFA, and MTFA between ontogenic stages pairs. SIMPER provided average dissimilarity (%) and the top 70 % contributing fatty acids. Pair-wise tests were done for each fatty acid group, and the mass of total fatty acid (MTFA) with the p-value indicated whether it is significant between ontogenic stages. SFA: saturated FA; MUFA: monounsaturated FA; PUFA: polyunsaturated FA.

<b>SIMPER</b>	<b>A+B</b>	<b>A+C</b>	<b>A+D</b>	<b>A+E</b>	<b>B+C</b>	<b>B+D</b>	<b>B+E</b>	<b>C+D</b>	<b>C+E</b>	<b>D+E</b>		
Average dissimilarity (%)	10.67	14.94	35.48	34.37	11.17	33.81	32.97	30.54	28.13	22.10		
Contributing fatty acids (top 70%)	16:0	16:0	18:3n3	18:3n3	18:1n9 (Z)	18:3n3	18:3n3	18:3n3	18:3n3	18:3n3		
	18:1n9 (Z)	18:1n9 (Z)	22:6n3	18:1n9 (Z)	18:0	22:6n3	22:6n3	22:6n3	22:6n3	22:6n3		
	22:6n3	22:6n3	16:0	16:0	16:0	16:0	18:1n9 (Z)	18:1n9 (Z)	18:1n9 (Z)	20:5n3		
	18:2n6 (Z)	18:0	18:2n6 (Z)	22:6n3	22:6n3	18:2n6 (Z)	20:5n3	16:0	20:5n3	18:1n9(Z)		
	20:1	18:2n6 (Z)	18:1n9 (Z)	20:5n3	18:2n6 (Z)	16:0	16:0	20:5n3	18:2n6 (LA)	18:2n6 (LA)		
	16:1	16:1	18:0	16:1	16:1			16:0	16:0	22:1		
										16:0		
Pair-wise test	p-value											
	CONTROL				BREED-M				ULVA			
Ontogenic stage	SFA	MUFA	PUFA	MTFA	SFA	MUFA	PUFA	MTFA	SFA	MUFA	PUFA	MTFA
A+B	0.335	0.356	0.738	0.466	0.007**	0.593	0.033*	0.405	0.069	0.266	0.942	0.201
A+C	0.029*	0.049*	0.195	0.854	0.011*	0.884	0.085	0.354	0.911	0.207	0.446	0.025*
A+D	0.338	0.331	0.32	1.000	0.069	0.183	0.065	0.254	0.026*	0.676	0.27	0.889
A+E	0.063	0.081	0.19	0.665	0.066	0.665	0.072	0.051	0.483	0.143	0.191	0.269
B+C	0.007**	0.131	0.139	0.546	0.324	0.659	0.752	0.403	0.125	0.755	0.55	0.233
B+D	0.288	0.059	0.084	0.803	0.03*	0.032*	0.031*	0.394	0.438	0.12	0.299	0.334
B+E	0.023*	0.032*	0.024*	0.333	0.027*	0.128	0.034*	0.033*	0.64	0.351	0.326	0.346
C+D	0.422	0.025*	0.017*	0.712	0.026*	0.054	0.026*	0.944	0.11	0.112	0.06	0.028*
C+E	0.22	0.007**	0.002**	0.182	0.014*	0.431	0.027*	0.06	0.336	0.08	0.145	0.071
D+E	0.064	0.073	0.07	0.575	0.333	0.322	0.335	0.344	0.466	0.144	0.33	0.268

The fatty acid composition of larvae from 2, 13, and 15 DPH are presented in Annex I. For the embryonic stage, SFAs were higher for eggs from the Breed-M treatment with 16:0 being the main contributor while the MUFAs were similar between eggs of genitors fed the Breed-M and *Ulva* diets with the control diet having the highest value (Table 11). The *Ulva* eggs had the highest PUFAs (DHA and LA), MTFAs, and DHA/EPA, and EPA/ARA ratios. Egg and newly hatched larvae had similar FA profiles. The most notable variations were noted for the SFAs, and the MTFAs which were lower in progeny after hatch for the Breed-M and *Ulva* diets, yet higher for the control. Once larvae started feeding at the mouth-opening stage, SFAs were higher in larvae of Breed-M and control treatments but had lower PUFAs proportions when compared to the *Ulva* diet treatment. The DHA/EPA ratio was highest in mouth-opening larvae from the *Ulva*-fed broodstock, though this ratio decreased for all treatments after the live-prey stage (Table 12). The MTFAs level remained consistently highest in the *Ulva* larval group until weaning while SFAs in larvae remained stable for both the control and *Ulva* treatments. In contrast, SFAs levels in larvae from the Breed-M treatment decreased at the live-prey stage and remained stable thereafter. Larval MUFA levels steadily decreased in the *Ulva* treatment, while PUFA levels increased until the weaning period. As for the control and Breed-M larvae, their MUFA proportion increased after the live-prey stage while their PUFA proportion was lower at weaning. Post mouth-opening stage, larvae from control and *Ulva* treatments had a higher  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 ratio. Larvae from only the *Ulva* treatment had the highest DHA/EPA ratio in the first three days post-hatch, which gradually declined until weaning, whereas the EPA/ARA ratio peaked at weaning.

Table 11. Fatty acid composition of eggs and newly hatched larvae (values as mean  $\pm$  SD with concentrations expressed as relative percentages of mass of total fatty acids (MTFA) for the 3 diet treatments (control, Breed-M, and *Ulva*) fed to the *Trachinotus carolinus* broodstock. The MTFA content was expressed in mg g<sup>-1</sup> and is shown at the bottom of the table with the ratios and the average similarity within each ontogenic group. The main fatty acids contributing >10 % to the differences in each ontogenic stage (SIMPER outputs) are in bold and letters indicate significant differences between diets. Fatty acids contributing to less than 1 % were removed but added to the total SFA, MUFA, and PUFA. SFA: saturated FA; MUFA: monounsaturated FA; LA: linoleic acid; LNA: linolenic acid; ARA: arachidonic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; PUFA: polyunsaturated FA.

Fatty acid	Embryonic stage			Newly hatched larvae		
	Control n = 2	Breed-M n = 4	<i>Ulva</i> n = 4	Control n = 4	Breed-M n = 7	<i>Ulva</i> n = 2
14:0	2.34 $\pm$ 0.32	1.82 $\pm$ 0.25	0.97 $\pm$ 0.10	2.23 $\pm$ 0.14	1.65 $\pm$ 0.21	0.80 $\pm$ 0.02
16:0	<b>15.87 <math>\pm</math> 0.79</b>	<b>22.12 <math>\pm</math> 3.28</b>	<b>14.59 <math>\pm</math> 1.72</b>	<b>17.95 <math>\pm</math> 4.35</b>	<b>15.86 <math>\pm</math> 2.55</b>	<b>12.52 <math>\pm</math> 0.17</b>
18:0	4.12 $\pm$ 0.89	7.82 $\pm$ 1.12	4.96 $\pm$ 1.60	5.07 $\pm$ 0.07	8.06 $\pm$ 0.38	4.06 $\pm$ 0.61
$\Sigma$ SFA <sup><math>\alpha</math></sup>	22.84 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	33.77 $\pm$ 2.74 <sup>c</sup>	22.10 $\pm$ 1.63 <sup>b</sup>	28.04 $\pm$ 4.31 <sup>a</sup>	27.66 $\pm$ 2.54 <sup>a</sup>	18.52 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>
16:1	6.58 $\pm$ 0.47	4.58 $\pm$ 0.18	5.40 $\pm$ 0.57	7.15 $\pm$ 0.69	4.79 $\pm$ 0.63	4.46 $\pm$ 0.35
18:1n9 (Z)	<b>31.64 <math>\pm</math> 3.09</b>	<b>23.27 <math>\pm</math> 4.18</b>	<b>21.37 <math>\pm</math> 2.09</b>	<b>30.63 <math>\pm</math> 6.84</b>	<b>23.68 <math>\pm</math> 2.81</b>	<b>23.18 <math>\pm</math> 0.31</b>
18:1n9 (E)	4.24 $\pm$ 0.43	1.69 $\pm$ 1.31	2.78 $\pm$ 0.48	1.38 $\pm$ 0.40	2.08 $\pm$ 0.55	3.06 $\pm$ 0.55
20:1	1.37 $\pm$ 0.28	6.60 $\pm$ 1.55	2.86 $\pm$ 1.12	0.56 $\pm$ 0.79	5.58 $\pm$ 1.24	4.94 $\pm$ 1.58
$\Sigma$ MUFA <sup><math>\beta</math></sup>	44.57 $\pm$ 3.28 <sup>a</sup>	37.03 $\pm$ 4.18 <sup>a</sup>	33.52 $\pm$ 3.09 <sup>a</sup>	40.36 $\pm$ 4.86 <sup>a</sup>	38.00 $\pm$ 2.42 <sup>a</sup>	36.97 $\pm$ 2.33 <sup>a</sup>
18:2n6 (LA)	5.40 $\pm$ 0.00	8.13 $\pm$ 1.58	18.05 $\pm$ 3.39	5.08 $\pm$ 1.80	9.27 $\pm$ 1.68	14.00 $\pm$ 1.87
18:3n3 (LNA)	1.92 $\pm$ 0.90	1.13 $\pm$ 0.23	1.36 $\pm$ 0.24	2.40 $\pm$ 0.79	1.05 $\pm$ 0.12	1.34 $\pm$ 0.11
20:4n6 (ARA)	0	1.24 $\pm$ 0.12	0.98 $\pm$ 0.36	0.57 $\pm$ 0.81	1.66 $\pm$ 0.39	1.06 $\pm$ 0.18
20:5n3 (EPA)	7.55 $\pm$ 0.56	2.45 $\pm$ 0.38	2.48 $\pm$ 0.40	6.74 $\pm$ 0.34	2.88 $\pm$ 0.33	2.58 $\pm$ 0.12
22:6n3 (DHA)	<b>17.73 <math>\pm</math> 2.18</b>	<b>15.80 <math>\pm</math> 1.28</b>	<b>21.26 <math>\pm</math> 2.81</b>	<b>18.72 <math>\pm</math> 2.53</b>	<b>18.97 <math>\pm</math> 1.82</b>	<b>25.08 <math>\pm</math> 1.37</b>
$\Sigma$ PUFA <sup><math>\delta</math></sup>	32.60 $\pm$ 3.63 <sup>ab</sup>	29.19 $\pm$ 2.07 <sup>a</sup>	44.38 $\pm$ 4.58 <sup>b</sup>	31.59 $\pm$ 2.67 <sup>a</sup>	34.34 $\pm$ 3.25 <sup>a</sup>	44.52 $\pm$ 3.19 <sup>b</sup>
$\omega$ -3/ $\omega$ -6	5.04 $\pm$ 0.67 <sup>ab</sup>	2.12 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>	1.34 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	4.95 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>	2.13 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	1.93 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
EPA/ARA	0 <sup>a</sup>	1.98 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	2.81 $\pm$ 1.08 <sup>b</sup>	1.53 $\pm$ 3.06 <sup>a</sup>	2.18 $\pm$ 1.04 <sup>a</sup>	2.48 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>
DHA/EPA	2.35 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	6.56 $\pm$ 1.19 <sup>a</sup>	8.66 $\pm$ 1.50 <sup>a</sup>	2.60 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	6.64 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	9.73 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>
MTFA	4.02 $\pm$ 1.48 <sup>a</sup>	11.26 $\pm$ 1.87 <sup>a</sup>	17.69 $\pm$ 3.16 <sup>a</sup>	4.74 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	10.43 $\pm$ 1.30 <sup>b</sup>	13.27 $\pm$ 2.95 <sup>b</sup>
Average similarity %	89.86			86.40		

$\alpha$ : includes C15:0, C17:0, C20: and C22:0, whose combined percentages are  $\leq$  2% of total fatty acids.

$\beta$ : includes C17:1, C22:1 and C24:1, whose combined percentage is  $\leq$  2% of total fatty acids.

$\delta$ : includes C20:2 and C20:3, whose combined percentages are  $\leq$  1% of total fatty acids.

Table 12. Fatty acid composition of larvae (values as mean  $\pm$  SD), with concentrations expressed as relative percentages of mass of total fatty acids (MTFA), for the 3 diet treatments (control, Breed-M, and *Ulva*) fed to the *Trachinotus carolinus* broodstock and the ontogenic stages (mouth-opening, live-prey, and weaning stages). The MTFA content was expressed in mg g<sup>-1</sup> and is shown at the bottom of the table with the ratios and the average similarity within each ontogenic group. The main fatty acids contributing >10% to the differences in each ontogenic stage (SIMPER outputs) are in bold and letters indicate significant differences among diets. Fatty acids contributing to less than 1 % were removed but added to the total SFA, MUFA, and PUFA. SFA: saturated FA; MUFA: monounsaturated FA; LA: linoleic acid; LNA: linolenic acid; ARA: arachidonic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosaheptaenoic acid; PUFA: polyunsaturated FA.

Fatty acid	Ontogenic stage								
	Mouth-opening			Live-prey			Weaning		
	Control n = 7	Breed-M n = 8	<i>Ulva</i> n = 4	Control n = 2	Breed-M n = 2	<i>Ulva</i> n = 4	Control n = 4	Breed-M n = 2	<i>Ulva</i> n = 2
14:0	2.16 $\pm$ 0.23	0.54 $\pm$ 0.59	0.47 $\pm$ 0.06	0.92 $\pm$ 0.06	0.40 $\pm$ 0.06	0.38 $\pm$ 0.01	2.22 $\pm$ 0.40	0	2.18 $\pm$ 0.19
16:0	<b>21.66 <math>\pm</math> 2.22</b>	<b>15.21 <math>\pm</math> 2.10</b>	<b>13.14 <math>\pm</math> 2.01</b>	18.69 $\pm$ 1.64	8.14 $\pm$ 1.62	8.79 $\pm$ 1.51	<b>20.54 <math>\pm</math> 0.77</b>	<b>4.52 <math>\pm</math> 0.57</b>	<b>9.71 <math>\pm</math> 1.84</b>
17:0	0.71 $\pm$ 0.20	0.65 $\pm$ 0.13	0.40 $\pm$ 0.03	0.88 $\pm$ 0.03	0.84 $\pm$ 0.07	0.72 $\pm$ 0.04	0.81 $\pm$ 0.06	1.13 $\pm$ 0.08	0.68 $\pm$ 0.10
18:0	<b>9.22 <math>\pm</math> 0.55</b>	<b>11.24 <math>\pm</math> 1.22</b>	<b>7.19 <math>\pm</math> 0.63</b>	11.59 $\pm$ 0.44	9.66 $\pm$ 1.32	8.82 $\pm$ 0.65	<b>11.55 <math>\pm</math> 0.38</b>	<b>11.27 <math>\pm</math> 0.65</b>	<b>6.84 <math>\pm</math> 0.17</b>
$\Sigma$ SFA <sup>a</sup>	34.55 $\pm$ 2.32 <sup>a</sup>	28.92 $\pm$ 2.43 <sup>b</sup>	22.06 $\pm$ 1.78 <sup>c</sup>	33.01 $\pm$ 1.91 <sup>a</sup>	19.84 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	19.54 $\pm$ 1.48 <sup>b</sup>	36.56 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>	18.35 $\pm$ 0.97 <sup>b</sup>	20.13 $\pm$ 1.73 <sup>b</sup>
16:1	4.18 $\pm$ 0.27	3.35 $\pm$ 0.51	2.34 $\pm$ 0.22	2.38 $\pm$ 0.62	2.34 $\pm$ 0.21	2.61 $\pm$ 0.09	2.76 $\pm$ 0.11	5.53 $\pm$ 0.12	5.77 $\pm$ 0.36
17:1	0	0.52 $\pm$ 0.10	0.17 $\pm$ 0.35	0.28 $\pm$ 0.29	1.05 $\pm$ 0.00	1.22 $\pm$ 0.06	0.58 $\pm$ 0.05	0.56 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.02
18:1n9 (Z)	<b>26.45 <math>\pm</math> 3.41</b>	<b>23.06 <math>\pm</math> 2.30</b>	<b>24.20 <math>\pm</math> 2.80</b>	<b>16.84 <math>\pm</math> 1.16</b>	<b>19.31 <math>\pm</math> 1.32</b>	<b>19.77 <math>\pm</math> 2.06</b>	<b>18.35 <math>\pm</math> 0.89</b>	<b>14.97 <math>\pm</math> 0.06</b>	<b>11.28 <math>\pm</math> 1.18</b>
18:1n9 (E)	3.75 $\pm$ 0.33	3.71 $\pm$ 2.84	2.90 $\pm$ 0.22	2.51 $\pm$ 0.49	3.10 $\pm$ 1.57	4.69 $\pm$ 0.18	3.17 $\pm$ 0.15	1.78 $\pm$ 0.11	2.29 $\pm$ 0.03
20:1	0.87 $\pm$ 0.20	5.38 $\pm$ 1.04	5.34 $\pm$ 0.71	1.43 $\pm$ 1.17	4.39 $\pm$ 0.43	4.10 $\pm$ 0.29	1.95 $\pm$ 0.26	6.88 $\pm$ 0.41	5.19 $\pm$ 0.22
22:1	0	0.71 $\pm$ 0.21	0	0	0.28 $\pm$ 0.14	0	1.14 $\pm$ 0.28	4.88 $\pm$ 0.38	3.77 $\pm$ 0.04
24:1	0.82 $\pm$ 0.39	0.62 $\pm$ 0.10	1.12 $\pm$ 0.15	0.55 $\pm$ 0.04	0.30 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.03	0.87 $\pm$ 0.10
$\Sigma$ MUFA	36.06 $\pm$ 3.42 <sup>a</sup>	37.35 $\pm$ 3.40 <sup>a</sup>	36.08 $\pm$ 2.31 <sup>a</sup>	23.98 $\pm$ 2.55 <sup>a</sup>	30.76 $\pm$ 0.72 <sup>b</sup>	32.80 $\pm$ 2.23 <sup>b</sup>	27.87 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	35.14 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>	29.74 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>
18:2n6 (LA)	5.97 $\pm$ 0.77	7.79 $\pm$ 1.56	9.99 $\pm$ 2.14	<b>11.72 <math>\pm</math> 0.08</b>	<b>13.11 <math>\pm</math> 0.92</b>	<b>11.26 <math>\pm</math> 0.72</b>	6.18 $\pm$ 0.69	9.32 $\pm$ 0.42	8.32 $\pm$ 0.58
18:3n3 (LNA)	1.95 $\pm$ 0.32	0.97 $\pm$ 0.27	1.16 $\pm$ 0.27	<b>18.56 <math>\pm</math> 0.99</b>	<b>18.89 <math>\pm</math> 0.72</b>	<b>21.29 <math>\pm</math> 2.33</b>	<b>17.56 <math>\pm</math> 2.40</b>	<b>9.48 <math>\pm</math> 0.40</b>	<b>10.02 <math>\pm</math> 0.67</b>
20:2	0.72 $\pm$ 0.54	0.60 $\pm$ 0.12	0.57 $\pm$ 0.09	1.05 $\pm$ 0.23	0.95 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.05	0.58 $\pm$ 0.08	0.59 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.01
20:4n6 (ARA)	0.94 $\pm$ 0.54	2.15 $\pm$ 0.47	1.46 $\pm$ 0.24	2.76 $\pm$ 0.55	2.41 $\pm$ 0.16	1.62 $\pm$ 0.18	1.16 $\pm$ 0.17	2.20 $\pm$ 0.23	1.36 $\pm$ 0.03
20:3	0	0	0	0	2.66 $\pm$ 0.89	2.09 $\pm$ 0.38	2.60 $\pm$ 0.15	1.86 $\pm$ 0.21	1.17 $\pm$ 0.23
20:5n3 (EPA)	5.09 $\pm$ 0.81	2.96 $\pm$ 0.49	2.99 $\pm$ 0.52	3.36 $\pm$ 0.19	5.24 $\pm$ 0.20	4.05 $\pm$ 0.34	3.61 $\pm$ 0.51	12.19 $\pm$ 0.08	13.48 $\pm$ 1.31
22:6n3 (DHA)	<b>14.70 <math>\pm</math> 1.30</b>	<b>19.26 <math>\pm</math> 2.40</b>	<b>25.69 <math>\pm</math> 1.87</b>	5.55 $\pm$ 0.59	5.32 $\pm$ 0.01	5.72 $\pm$ 0.39	3.77 $\pm$ 0.33	10.86 $\pm$ 0.26	15.04 $\pm$ 0.69
$\Sigma$ PUFA	29.38 $\pm$ 1.62 <sup>a</sup>	33.73 $\pm$ 4.17 <sup>a</sup>	41.87 $\pm$ 4.00 <sup>b</sup>	43.00 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>	49.39 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	47.66 $\pm$ 2.24 <sup>b</sup>	35.57 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>	46.50 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	50.11 $\pm$ 2.24 <sup>c</sup>
$\omega$ -3/ $\omega$ -6	3.17 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	2.37 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	2.68 $\pm$ 0.51 <sup>ab</sup>	1.90 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.85 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	2.42 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	3.80 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>	2.86 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	3.88 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
EPA/ARA	4.38 $\pm$ 2.46 <sup>a</sup>	1.41 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	2.09 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	1.23 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2.01 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	2.54 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup>	3.15 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	3.66 $\pm$ 2.16 <sup>a</sup>	9.94 $\pm$ 1.16 <sup>b</sup>
DHA/EPA	2.94 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	6.60 $\pm$ 0.84 <sup>b</sup>	8.79 $\pm$ 1.81 <sup>c</sup>	1.65 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.02 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	1.43 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	1.05 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.89 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.12 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
MTFA	4.52 $\pm$ 2.22 <sup>a</sup>	9.56 $\pm$ 3.15 <sup>b</sup>	10.70 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>	4.44 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	9.45 $\pm$ 1.19 <sup>b</sup>	17.20 $\pm$ 3.87 <sup>c</sup>	6.19 $\pm$ 4.01 <sup>a</sup>	22.28 $\pm$ 4.63 <sup>b</sup>	22.17 $\pm$ 4.60 <sup>b</sup>
Average similarity (%)		92.14			93.95			95.32	

<sup>a</sup>: includes C15:0, C20: and C22:0, whose combined percentages are  $\leq$  2% of total fatty acids.

Fatty acid profiles of eggs were characterized by high proportions of 18:1n9(Z), 16:0, and DHA. More specifically, eggs obtained from the broodstock fed with the *Ulva* diet showed a higher DHA content. The eggs produced by females fed on Breed-M and control diets had mainly 18:1n9(Z) but were not grouped in the dbRDA as their proportion of FA was different (Figure 14). As the newly hatched larvae's fatty acid profile was similar to egg profiles, it was not shown in the dbRDA. The fatty acid composition for larvae at the mouth-opening stage was characterized by higher proportions of DHA and 16:1 for *Ulva* and Breed-M diets whereas the control diet had mostly 16:0 and 18:1n9 (Figure 14). For the live-prey stage, larvae from the Breed-M and *Ulva* had a higher proportion of 18:3n3 compared to control larvae. Finally, for the weaning stage, the most important differences were observed between diet treatments, with larvae from Breed-M and *Ulva* diets displaying a higher abundance of EPA, 20:1, and LA, contrary to control showing a similar pattern that the previous live-prey stage.

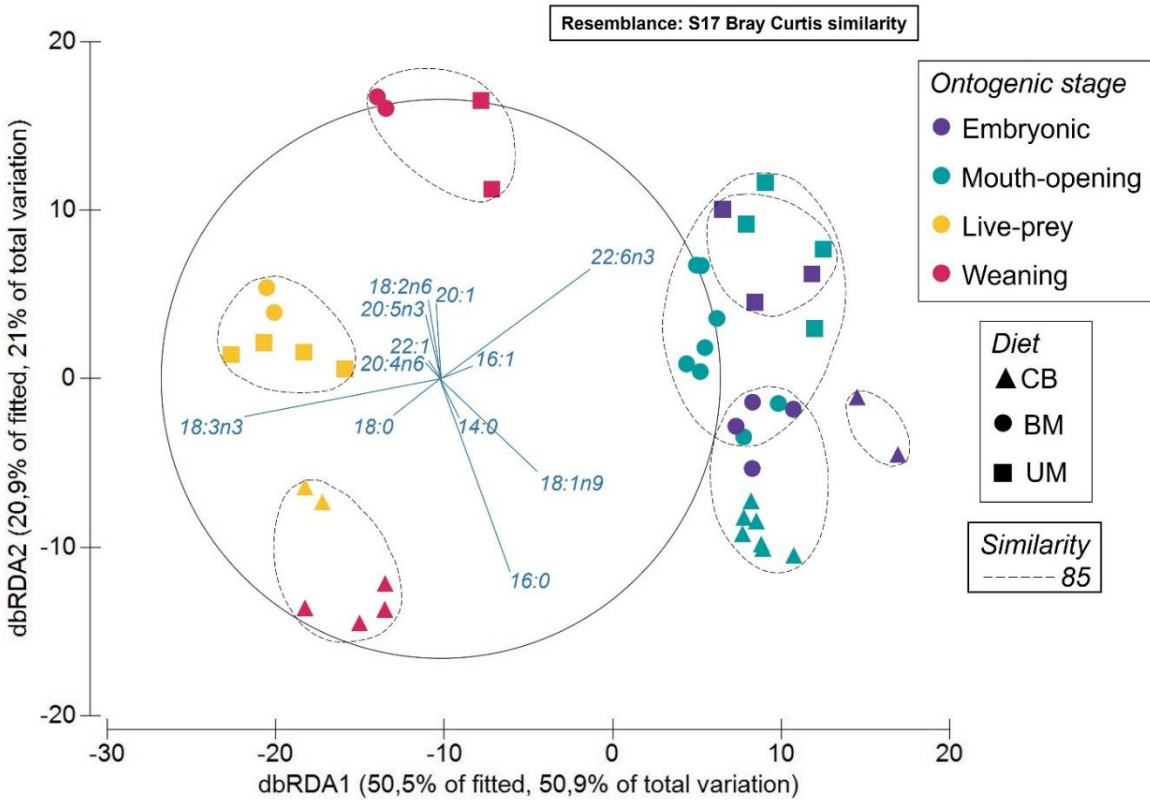


Figure 14. Distance-based redundancy analysis (dbRDA) on the Bray-Curtis dissimilarity matrix for fatty acid profile (in relative percentages) of larvae obtained from broodstock fed different diets and of different ontogenic stages (embryonic, mouth-opening, live-prey, and weaning) with an 85% similarity between samples (circled in black) which were confirmed with a cluster diagram (see annex II). Fatty acids with less than 2 % of the contribution to the total fatty acid concentration were removed from the analysis to showcase the main FA. Vector overlays represent the strength of the relationship between the different fatty acids and the axes of the dbRDA.

## 1.4 DISCUSSION

The IMTA-sourced *U. lactuca* has been shown to offer many benefits as well as having numerous applications including its role as a dietary source of protein in fish feed (Shpigel *et al.*, 2017). Yet, the inclusion of *Ulva* spp. in feed has been mostly assessed for herbivorous

and freshwater fish species, as summarized in Shpigel *et al.* (2017), or used as a replacement for plant proteins and not dietary fish meal (Valente *et al.*, 2006; Diler *et al.*, 2007; Azaza *et al.*, 2008). To our knowledge, no study has investigated the substitution of fish meal by macroalgae on fish reproductive success in warm-water marine fish species, particularly for carnivorous species. Thus, this is the first study evaluating and comparing commonly used broodstock feeds, such as commercial and cut-bait diets, with an experimental diet with a 10 % fish meal substitution by IMTA-sourced *U. lactuca* meal on the reproductive performance of the marine fish Florida Pompano *T. carolinus* broodstock. Our hypothesis, that the reproductive performance of *T. carolinus* broodstock fed an experimental feed containing *U. lactuca* would be similar and even higher when compared to broodstock fed a cut-bait diet (control) or a commercial feed (Breed-M), was supported by our results.

#### **1.4.1 Dietary requirements of Florida pompano**

The Florida Pompano dietary requirements have been as this species has been gaining popularity as a new aquaculture species (Weirich *et al.*, 2021). As mentioned by the same authors, similar to other marine carnivorous fish, *T. carolinus* has high energy needs typically met with dietary crude proteins and crude fats. The optimal crude protein requirement for this fish is 46 % and, although the control ( $84.26 \pm 1.85$  %) and Breed-M ( $63.21 \pm 0.45$  %) diets respected this value, the *Ulva* diet, on the other hand, was slightly under the recommended threshold with  $41.11 \pm 0.68$  % crude proteins. As dietary protein can affect the reproductive performance of marine fish, this requirement must be met. However, the results of this study suggest that the requirement can be below 42 %, as already indicated by Izquierdo and Fernandez-Palacios (1997) and Gothreaux (2008). As for the fat content, Breed-M and *Ulva* diets can provide a much higher crude fat content, of  $14.17 \pm 0.17$  % and  $12.84 \pm 0.42$  % respectively, comparatively to the control diet ( $2.54 \pm 0.41$  %), which is especially essential for broodstock as they need a high energy reserve to spawn consistently in addition to transferring enough essential fatty acids to their offspring (Izquierdo and Fernandez-Palacios, 1997).

### 1.4.2 Spawning performance and egg quality

General characteristics of progeny can serve as proxies for spawning performance such as the number of eggs per ml, hatch and fertilization rates, the egg and oil droplet diameters, and newly hatched larvae length. The highest hatch rate (93 %) was observed in larvae obtained from breeders fed the *Ulva* diet, followed by 78 % for eggs obtained from broodstock fed the control diet. Similar hatching rates (>75 %) have been observed for *T. carolinus* in prior studies with some differences noted depending on the hatching temperatures (Main *et al.*, 2007; Weirich *et al.*, 2021). For the fertilization rate, all values were between 75 and 80 % for eggs collected from breeding fish and the diet had no effect. The fertilization rates obtained within this study were consistent with the values over 70 % reported by Weirich and Riley (2007) but not over 90 % as mentioned by Weirich *et al.* (2021). The latter authors suggested that a considerable variation in fertilization rates, as reflected in Breed-M values, might be associated with suboptimal egg quality, although additional evidence is needed to establish this interpretation. In some species, the fertilization rates could be correlated with HUFAs in broodstock feed, such as EPA and ARA (Izquierdo *et al.*, 2001). However, regardless of the control feed having the highest levels of HUFAs, no differences were found in the fertilization rates in our data. The number of eggs per ml obtained from *T. carolinus* females for all diets was on average between 1300 and 1600 while it was generally around 1200 and 1300 eggs per ml as reviewed in Weirich and Riley (2007). The slight differences between diet treatments were most likely due to the egg size, which is coherent with our results as the higher number of eggs per ml was associated with eggs of smaller sizes. Egg diameter was between 960 and 1000  $\mu\text{m}$  for all spawns, following the different diet treatments, comparable to prior studies with diameters ranging from 870 to 1000  $\mu\text{m}$  (Hoff *et al.*, 1978). According to the same authors, the oil globule was on average 250  $\mu\text{m}$  in diameter, correspondingly to the diameter of the oil globule of eggs obtained from females fed from the three experimental diets (ranging 260 to 280  $\mu\text{m}$ ).

The size of eggs has been illustrated as a potential indicator of reproductive success in marine finfish by assuming larger eggs have greater metabolic reserves, potentially leading



to better larvae survival (Stuart *et al.*, 2020). The egg diameter could correspondingly influence hatch and fertilization rates, as well as the larval length at hatch but may vary depending on the age, size, and wild or cultured inheritance of females or even the quality of sperm (Lund *et al.*, 2008). The egg size could even be correlated to specific fatty acids as mentioned in Stuart *et al.* (2020), where a correlation was found between egg diameter and linoleic acid (LA) in California yellowtail (*Seriola dorsalis*), a species from the Carangidae family. This correlation seems to correspond to our results as the eggs from breeders for the *Ulva* diet eggs had an important LA content compared to other diets and seemingly a larger egg size.

As fatty acids represent the main metabolic energy source during the embryonic development of marine fish eggs, the fatty acid profile can therefore be used to assess the quality of the spawn and progeny (Huang *et al.*, 2022). The essential nutrients found in the diets fed to the broodstock are typically assimilated in the body reserves of females which are then transferred to the eggs. As a result, it is commonly accepted that the fatty acid composition of the maternal diet will be correlated to the composition of the eggs, which was in accord with our results for most fatty acids. The four main fatty acids in broodstock eggs were 18:1n9(Z), DHA, 16:0 and EPA for fish fed the control diet, 18:1n9(Z), 16:0, DHA and LA for Breed-M, and DHA, 18:1n9(Z), LA and 16:0 for the *Ulva* diet. All these fatty acids are similarly found in numerous marine fish eggs during early developmental stages as they are crucial for embryonic development (Huang *et al.*, 2022), yet their rank of importance is dependent on the diet treatment. The increased presence of LA observed in Breed-M and *Ulva* diet treatments, as well as in the resulting eggs, may be attributed to the inclusion of vegetable oils (Álvarez *et al.*, 2020). The high levels of 18:1n9 in the control eggs may be in response to the significant presence of 18:0 in the control feed (Jackson *et al.*, 2020). Marine predators, such as *T. carolinus*, could *de novo* synthesize specific FAs resulting in their higher proportion (Hou and Fuiman, 2020). It was later demonstrated by Bradshaw II *et al.* (2023) that such biosynthesis in *T. carolinus* is possible. This biosynthesis could partly explain the importance of 18:1n9 throughout the embryonic stage.

SFA and MUFA are respectively consumed as an energy source while n-6 and n-3 PUFAs are mainly preserved for the embryonic stage, as confirmed in many marine finfish studies (Huang *et al.*, 2022). From fertilized egg to newly hatched larvae, progeny obtained from females fed Breed-M and the *Ulva* diet consumed SFA (specifically 16:0) as energy while embryos from females fed the control diet consumed MUFAs (specifically 18:1n9E). This MUFA utilization may be due to its higher proportion of eggs from the control diet, leading to their preferential use before the SFAs. These results are supported by Huang *et al.* (2022) who observed that both SFA and MUFA are used as energy substrates during embryonic development of warm-water marine fish such as cobia (*Rachycentron canadum*). The PUFAs remained stable from egg to larvae for all diets but the progeny obtained with the *Ulva* diet had a proportion of LA reduced while the DHA content increased. It was noted that DHA proportions remained stable during the endogenous period for Florida Pompano larvae; however, they experienced a significant decrease after the mouth-opening stage, likely due to the predominant consumption of this specific fatty acid. This may indicate the low biosynthesis capacity of this essential FA (Huang *et al.*, 2022).

The Florida Pompano is known for having minimal capacities to elongate and desaturate fatty acids from C18:0 precursors, such as LA and LNA, to form EFA (DHA, EPA, ARA), and may be able to thrive on diets containing only C18:0, although not recommended (Hauville *et al.*, 2016; Jackson *et al.*, 2020). As such, this biosynthetic capacity could partly explain the higher proportions of these EFA, as well as LA and LNA, in eggs and larvae even though the *Ulva* feed contained the lowest proportions out of all experimental diets, but it may not be the main cause. A study on the black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) mentioned that the inclusion of 10 % of *U. lactuca* in the feed stimulated lipid metabolism, which resulted in an increase of the lipid content and the subsequent mobilization in fish tissues (Nakagawa *et al.*, 1987). There have been numerous studies which have shown in multiple fish species, such as the Atlantic salmon (*Salmo salar*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), red sea bream (*Pagrus major*), and common carp (*Cyprinus carpio*), that the inclusion of seaweed can alter the lipid metabolism of the organisms (Wilke *et al.*, 2015). The addition of marine algae in the feed of salmon led to increased lipid content and

elevated flesh DHA and EPA concentrations in Wilke *et al.* (2015). It could therefore be possible that seaweed contains bioactive compounds that may reduce 18:3n3 while increasing the n-3 PUFAs, which could be due to the high activity of key enzymes in lipid mobilization (Wilke *et al.*, 2015; Martínez-Antequera *et al.*, 2021). As such, this could potentially explain the reason why the eggs and larvae obtained from broodstock fed an *Ulva*-enriched diet had an important MTFAs content as well as the highest DHA proportions throughout larval development.

### 1.4.3 Larval performance

Newly hatched larvae from females fed the control and *Ulva* diets were of similar body and yolk sac lengths, correlating with data from Riley *et al.* (2009), with the larval length between 2.2 and 3.0 mm and a yolk sac of 1.0-1.1 mm (Hoff *et al.*, 1978). Following hatching, the total fatty acid content was reduced as the larvae consumed lipids for energy, which is common in fast-developing eggs (Hauville *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2022). This was not observed for embryos from the control diet where the MTFAs remained constant. Given that the protein and fiber contents within the control diet were higher than those in the other diets, it is possible that the energetic needs of the eggs were supported by energy sources other than primarily fatty acids (Rønnestad and Fyhn, 1993; Rainuzzo *et al.*, 1997; Lund *et al.*, 2008; Parrish, 2013). The MTFAs from larvae obtained from broodstock fed *Ulva* reduced rather quickly after hatch (from  $17.69 \pm 3.16$  to  $13.27 \pm 2.95$  mg g<sup>-1</sup>) compared to other diets, as illustrated by the important decrease of both yolk sac and oil droplet lengths. This could indicate the efficient utilization of their endogenous reserves for growth and development of anatomical and digestive structures as they start exogenous feeding earlier (50 to 75 hpf) than larvae obtained from control and Breed-M spawns. As such, in Hoff *et al.* (1978), 1 DPH larvae were around 2.4 and 3.2 mm, while the yolk sac decreased to 0.4 mm in length, which is similar to the lengths found in our results. These authors showed that the yolk would be completely consumed by 77 hpf which is similar to our results with the yolk depleted by 85-95 hpf. Larvae from *Ulva* and control diets spawn had endogenous reserves lasting well over the 3-day period, meaning they would be less likely to die from starvation

as they have more time to initiate exogenous feeding. The first 2 to 3 days of *T. carolinus* larvae are crucial as it is the endogenous feeding period, meaning they live off their reserves, obtained from the maternal investment. The mouth-opening stage is therefore a critical step to exogenous feeding as mortality is at its highest (Yúfera and Darias, 2007). As the *Ulva* diet contained a high content of LA and LNA comparatively to other experimental diets, the eggs up to mouth-opening stage larvae contained subsequently a high proportion of those fatty acids, particularly LA, which was consumed as a main energy source (Hauville *et al.*, 2014).

Essential fatty acids (EFA) have a significant role in the structural components of membrane phospholipids contributing to the functional physiology of marine fish (Izquierdo and Fernandez-Palacios, 1997). Among the EFAs, DHA is especially indispensable as it is the main FA for neural and visual tissues in larval development (Hauville *et al.*, 2014). It was also observed that the ARA proportion was higher in newly hatched larvae compared to eggs, as reviewed for marine fish, thus suggesting a possible HUFA biosynthetic capacity of larvae (Zakeri *et al.*, 2011). Yet, the ARA content of progeny was generally lower than those obtained by Mejri *et al.* (2021) while showing a similar accumulation pattern in early development as Huang *et al.* (2022). ARA and DHA were both preferentially retained in early development, indicating a specific requirement for those FAs (Huang *et al.*, 2022). As such, the DHA level, as well as the DHA/EPA and EPA/ARA ratios were constantly high in eggs and larvae obtained from females fed the *Ulva* diet throughout development (Tocher, 2010). As those ratios are known to be better indicators than the actual specific FA content, high ratios could be interpreted as a low probability of physiological deformities and overall better growth (Sargent *et al.*, 1999; Tocher, 2010; Hauville *et al.*, 2014). Similarly, a positive correlation was identified between the DHA/EPA ratio and quality criteria in the Baltic cod (*Gadus morhua*), attesting to the importance of this ratio in spawning performance (Pickova *et al.*, 1997).

FA profiles of eggs and larvae varied amongst diet treatments until 3 DPH, which is the period of mouth opening, and they start feeding on live prey after depletion of their

maternal-obtained reserves. After 9 DPH, as all larvae were feeding off the same larval diets and under the same rearing conditions, the differences obtained were due to their morphological differences from their endogenous period. In other words, if larvae had high-quality reserves obtained from maternal investment, such as DHA, it is possible that upon entering the exogenous period they had potentially better assimilation and utilization of nutrients of EFA as they developed the proper anatomical structures, which larvae from *Ulva* diet exhibited (Yúfera and Darias, 2007). Larvae at the weaning stage exhibited the highest content of MTFAs across all diet treatments, possibly due to their accumulation of reserves from energy-rich larval feed (see annex III), yet the value was far superior for offspring obtained from the Breed-M and *Ulva* spawn comparatively to the control spawn. As larvae accumulate energy in the form of lipids, a high content could optimize the transition of larvae into juveniles (Yúfera and Darias, 2007).

## 1.5 CONCLUSION

The results obtained in this study suggest that marine carnivorous fish broodstock could be fed a feed where 10% of fish meal could be replaced by IMTA-sourced *U. lactuca* with a positive effect on egg quality and larval performance when compared to cut-bait and commercial diets. This could be due to a possible effect of the *U. lactuca* meal on the lipid metabolism of Florida Pompano, resulting in a better-quality FA profile of eggs and larvae and a high-quality spawn. The use of by-products from an IMTA to feed a species, found in the same system, supports, and validates the principles of circular production while reducing the animal protein in feeds. Thus, *U. lactuca* as a dietary substitute for fish meal in the broodstock diet is a sustainable and cost-friendly option to further explore in the future.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

La présente étude avait pour objectif de déterminer et de comparer l'impact d'une moulée expérimentale comprenant une substitution de 10 % de farine de poisson par la macroalgue *Ulva lactuca*, en provenance d'un système AMTI, sur la performance reproductive du Pompano de Floride. À plus grande échelle, ce remplacement avait pour but d'explorer la potentialité d'une réduction du coût de production et des impacts socio-économiques associés à l'aquaculture de poissons carnivores en réduisant la portion de farine animale dans les moulees commerciales. De plus, l'utilisation de sous-produits d'une polyculture (ex. macroalgues) dans l'alimentation de poissons d'eau chaude à croissance et à reproduction rapide, permettrait de rapidement valider le potentiel d'une économie circulaire d'un élevage AMTI et contribuer à la durabilité de l'industrie piscicole.

Les résultats de cette expérience ont permis de mettre en évidence l'effet positif d'une moulée expérimentale avec un remplacement de 10 % de farine de poisson par la macroalgue *U. lactuca* sur la qualité des œufs et le développement larvaire subséquent du Pompano de Floride. Cette qualité des œufs et des larves, en matière de composition en acides gras et de critères biologiques (c.-à-d. le diamètre de l'œuf et de la gouttelette d'huile, les taux de fécondation et d'éclosion et la taille de larve nouvellement éclos), était généralement supérieure lorsqu'obtenue de femelles nourries à la moulée *Ulva*. Les femelles nourries avec cette moulée ont produit des œufs de taille supérieure et avec un meilleur pourcentage d'éclosion. Ces œufs et larves avaient des concentrations supérieures en AGE que ceux produits par des femelles nourries avec les autres moulees. Ceci pourrait être causé par un effet de certains composés bioactifs de l'algue sur l'absorption lipidique et la capacité lipogénique du poisson, tel que mentionné dans Nakagawa *et al.* (1987) et Wilke *et al.* (2015). Ces résultats confirment ainsi la faisabilité d'un remplacement partiel de farine animale par une macroalgue dans la moulée de poissons carnivores sans impacts néfastes sur la performance reproductive des géniteurs.

Cette étude représente la première en son genre, puisque la majorité des travaux publiés portent plutôt sur l'impact d'une inclusion algale dans la moulée piscicole sur la croissance

ou la digestion du poisson au stade juvénile et adulte (voir la revue de Shpigel *et al.* 2017). Cette étude est d'autant plus significative compte tenu de l'importance de trouver des substituts de farine de poisson dans les moulées piscicoles, en raison du prix élevé et de la disponibilité limitée de cet ingrédient, tout en respectant les besoins nutritionnels des poissons en termes de protéines et de lipides. Ces résultats pourront contribuer à améliorer la durabilité écologique de l'industrie. Pour ce faire, il serait nécessaire de raffiner les techniques d'élevage, telles que la polyculture (par ex. système AMTI), tout en exploitant la composante algale du système en tant qu'ingrédient alimentaire adéquat pour améliorer la capacité reproductive de poissons. La présence d'une espèce extractive, c.-à-d. les macroalgues, permet également d'optimiser la qualité biochimique et la productivité du système ainsi que des autres composantes écosystémiques présentes, démontrant la pertinence d'utiliser cette technique d'élevage en pisciculture intensive.

### **Perspectives**

Bien que cette expérience amène des renseignements pertinents dans le domaine de la reproduction d'espèces carnivores, une augmentation du nombre de femelles aptes à se reproduire (seulement 2-3 femelles sur un total de 22 frayaient à chaque ponte), ainsi qu'une homogénéisation de la prise de données pour les larves, permettrait de renforcer le pouvoir prédictif de l'expérience. Entre autres, il serait pertinent d'expérimenter avec différents pourcentages d'inclusion afin de tester la limite physiologique d'acceptation des poissons carnivores. Cela permettrait également d'analyser l'effet d'une inclusion algale à long terme sur la morphologie des organismes au-delà du seuil de 8 semaines utilisé dans ce projet, voire même sur plusieurs générations de géniteurs. L'ajout d'*U. lactuca* dans la moulée des géniteurs pouvant avoir un effet sur l'absorption lipidique dans les tissus, il serait intéressant d'étudier l'impact de cette substitution sur la qualité de la chair des poissons et sur les mécanismes moléculaires et/ou cellulaires sous-jacents du métabolisme lipidique qui y sont associés.

Somme toute, cette étude permet de confirmer la faisabilité d'une production circulaire d'un système AMTI, dont les sous-produits algaux *U. lactuca* ont été intégrés avec succès

dans une moule de poissons-géniteurs carnivores du système, avec des résultats prometteurs sur la qualité de la progéniture. Étant donné l'importance de réduire les impacts environnementaux tout en améliorant les rendements de production de l'industrie piscicole, un tel ajout technologique pourrait s'avérer d'autant plus intéressant quant à son applicabilité en aquaculture pour des espèces d'eaux froides et tempérées.





## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Warith, A.-W. A., E.-S. M. Younis et N. A. Al-Asgah, 2016. Potential use of green macroalgae *Ulva lactuca* as a feed supplement in diets on growth performance, feed utilization and body composition of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **23**(3) : 404-409.
- Álvarez, A., R. Fontanillas, A. Hernández-Contreras et M. Hernández, 2020. Partial replacement of fish oil with vegetal oils in commercial diets: The effect on the quality of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Animal Feed Science and Technology*, **265** : 114504.
- Azaza, M., F. Mensi, J. Ksouri, M. Dhraief, B. Brini, A. Abdelmouleh et M. Kraïem, 2008. Growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed with diets containing graded levels of green algae *Ulva* meal (*Ulva rigida*) reared in geothermal waters of southern Tunisia. *Journal of Applied Ichthyology*, **24**(2) : 202-207.
- Berry, F. H. et E. S. Iversen, 1967. Pompano: biology, fisheries, and farming potential. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, **19** : 116-128.
- Bradshaw II, D. J., V. Uribe, L. E. King, C. S. Perricone, G. Illán, E. Allmon, M. Sepulveda, M. Riche, P. S. Wills et S. Mejri, 2023. Effects of low salinities on growth, fatty acid composition, and transcriptome in Florida pompano (*Trachinotus carolinus*) at early developmental stages. *Aquaculture*, **563** : 738964.
- Cai, J., H. L. Chan, X. Yan et P. Leung, 2023. A global assessment of species diversification in aquaculture. *Aquaculture*, **576** : 739837.
- Carballeira Braña, C. B., K. Cerbule, P. Senff et I. K. Stolz, 2021. Towards environmental sustainability in marine finfish aquaculture. *Frontiers in Marine Science*, **8** : 343.
- Cottrell, R. S., D. M. Ferraro, G. D. Blasco, B. S. Halpern et H. E. Froehlich, 2021. The search for blue transitions in aquaculture-dominant countries. *Fish and Fisheries*, **22**(5) : 1006-1023.
- Daniel, N., 2018. A review on replacing fish meal in aqua feeds using plant protein sources. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, **6**(2) : 164-179.
- Denadai, M. R., F. B. Santos, E. Bessa, W. S. Fernandez, F. Scaloppe et A. Turra, 2013. Population biology and diet of the pompano *Trachinotus carolinus* (Perciformes: Carangidae) in Caraguatatuba Bay, Southeastern Brazil. *Journal of Marine Biology & Oceanography* **2**, **2** : 2.
- Derbes II, T. J., 2017. Supplementing broodstock and larval diets for Florida pompano *Trachinotus carolinus* with taurine to improve egg, larval, and weaned juvenile quality [Mémoire de maîtrise]. Auburn University, 49 p.

- Diler, I., A. A. Tekinay, D. Guroy, B. K. Guroy et M. Soyuturk, 2007. Effects of *Ulva rigida* on the growth, feed intake and body composition of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Biological Sciences*, **7**(2) : 305-308.
- El-Tawil, N. E., 2010. Effects of green seaweeds (*Ulva sp.*) as feed supplements in red tilapia (*Oreochromis sp.*) diet on growth performance, feed utilization and body composition. *Journal of the Arabian Aquaculture Society*, **5**(2) : 179-194.
- Ergün, S., M. Soyutürk, B. Güroy, D. Güroy et D. Merrifield, 2009. Influence of *Ulva* meal on growth, feed utilization, and body composition of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at two levels of dietary lipid. *Aquaculture International*, **17** : 355-361.
- FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture: Sustainability in action. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 244 p. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
- Fernández-Palacios, H., M. S. Izquierdo, L. Robaina, A. Valencia, M. Salhi et J. Vergara, 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, **132**(3-4) : 325-337.
- Fernández-Palacios, H., B. Norberg, M. Izquierdo et K. Hamre, 2011. Effects of broodstock diet on eggs and larvae. In G. J. Holt (Ed.), Larval fish nutrition, John Wiley & Sons Inc., Oxford, United Kingdom, pp. 153-182. <https://doi.org/10.1002/9780470959862.ch5>
- Finucane, J. H., 1969. Ecology of the pompano (*Trachinotus carolinus*) and the permit (*T. falcatius*) in Florida. *Transactions of the American Fisheries Society*, **98**(3) : 478-486.
- Folch, J., M. Lees et G.H. Sloane Stanley, 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226**(1) : 497-509.
- Gaillard, B., T. Meziane, R. Tremblay, P. Archambault, M. E. Blicher, L. Chauvaud, S. Rysgaard et F. Olivier, 2017. Food resources of the bivalve *Astarte elliptica* in a sub-Arctic fjord: a multi-biomarker approach. *Marine Ecology Progress Series*, **567** : 139-156.
- Garlock, T., F. Asche, J. Anderson, T. Bjørndal, G. Kumar, K. Lorenzen, A. Ropicki, M. D. Smith et R. Tveterås, 2020. A global blue revolution: aquaculture growth across regions, species, and countries. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, **28**(1) : 107-116.
- Gephart, J., J. A. Gephart, R. A. Bejarano, K. Gorospe, A. Godwin, C. D. Golden, R. L. Naylor, K. L. Nash, M. L. Pace et M. Troell, 2023. Globalization of wild capture and farmed aquatic foods. *Authorea Preprints*.

- Gilbert, C. et J. Parsons, 1986. Species Profiles: Life Histories and Environmental Requirements of Coastal Fishes and Invertebrates (South Florida): Florida pompano (U.S. Fish and Wildlife Service Report 82 (11.42)). U.S. Army Corps of Engineers, Washington, DC.
- Glencross, B. D., 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, **1**(2) : 71-124.
- Gomez, A. et F. Cervigon, 1987. Perspectives of culture of marine fishes from south Caribbean sea and northeastern South America. *Revista Latinoamericana de Acuicultura*, **34** : 40-50.
- Gomez, A. et M. A. Scelzo, 1982. Polyculture experiments of pompano *Trachinotus carolinus* (Carangidae) and spotted red shrimp *Penaeus brasiliensis* (Penaeidae) in concrete ponds, Margarita Island, Venezuela. *Journal of the World Mariculture Society*, **13**(1-4) : 146-153.
- Gothreaux, C., 2008. Measurement of nutrient availability in feedstuffs for Florida pompano and development of formulated diets for pompano aquaculture [Mémoire de maîtrise]. Louisiana State University, 85 p.
- Groat, D. R., 2002. Effects of feeding strategies on growth of Florida pompano (*Trachinotus carolinus*) in closed recirculating systems [Mémoire de maîtrise]. Louisiana State University, 73 p.
- Güroy, B., S. Ergün, D. L. Merrifield et D. Güroy, 2013. Effect of autoclaved *Ulva* meal on growth performance, nutrient utilization and fatty acid profile of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture International*, **21** : 605-615.
- Güroy, B. K., Ş. Cirik, D. Güroy, F. Sanver et A. A. Tekinay, 2007. Effects of *Ulva rigida* and *Cystoseira barbata* meals as a feed additive on growth performance, feed utilization, and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, **31**(2) : 91-97.
- Hauville, M. R., K. L. Main, H. Migaud et J. Gordon Bell, 2016. Fatty acid utilization during the early larval stages of Florida pompano (*Trachinotus carolinus*) and Common snook (*Centropomus undecimalis*). *Aquaculture Research*, **47**(5) : 1443-1458.
- Hauville, M. R., J. L. Zambonino-Infante, G. Bell, H. Migaud et K. L. Main, 2014. Impacts of three different microdiets on Florida Pompano, *Trachinotus carolinus*, weaning success, growth, fatty acid incorporation and enzyme activity. *Aquaculture*, **422-423** : 268-276.
- Hodar, A., R. Vasava, D. Mahavadiya et N. Joshi, 2020. Fish meal and fish oil replacement for aqua feed formulation by using alternative sources: a review. *Journal of Experimental Zoology India*, **23**(1) : 13-21.

- Hoff, F., J. Mountain, T. Frakes et K. Halcott, 1978. Spawning, oocyte development and larvae rearing of the Florida pompano (*Trachinotus carolinus*). *Proceedings of the World Mariculture Society*, **9** : 279-297.
- Hou, Z. et L. A. Fuiman, 2020. Nutritional programming in fishes: insights from mammalian studies. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **30**(1) : 67-92.
- Huang, J.-S., R.-X. Li, R.-T. Xie, Y.-M. Chen, J.-D. Zhang, E. Amenyogbe et G. Chen, 2022. Changes in amino acid and fatty acid composition during early development in cobia (*Rachycentron canadum*). *Frontiers in Marine Science*, **9** : 995616.
- Izquierdo, M. et H. Fernandez-Palacios, 1997. Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock. *Cahier Options Méditerranéennes*, **22** : 243-264.
- Izquierdo, M., H. Fernandez-Palacios et A. Tacon, 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, **197**(1-4) : 25-42.
- Jackson, C. J., J. T. Trushenski et M. H. Schwarz, 2020. Assessing polyunsaturated fatty acid essentiality in Florida Pompano. *North American Journal of Aquaculture*, **82**(3) : 293-306.
- Khanzadeh, M., A. Esmaeili Fereidouni et S. Seifi Berenjestanaki, 2016. Effects of partial replacement of fish meal with *Spirulina platensis* meal in practical diets on growth, survival, body composition, and reproductive performance of three-spot gourami (*Trichopodus trichopterus*)(Pallas, 1770). *Aquaculture International*, **24**(1) : 69-84.
- Kissinger, K. R., A. García-Ortega et J. T. Trushenski, 2016. Partial fish meal replacement by soy protein concentrate, squid and algal meals in low fish-oil diets containing *Schizochytrium limacinum* for longfin yellowtail *Seriola rivoliana*. *Aquaculture*, **452** : 37-44.
- Kloth, T. C., 1980. Observations on the spawning behavior of captive Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. *Copeia*, **1980**(4) : 884-886.
- Kumpf, H. E., 1972. Temperature-salinity tolerance of the Florida pompano, *Trachinotus carolinus* (Linnaeus) [Thèse de doctorat]. University of Miami, 105 p.
- Laramore, S., R. Baptiste, P. S. Wills et M. D. Hanisak, 2018. Utilization of IMTA-produced *Ulva lactuca* to supplement or partially replace pelleted diets in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in a clear water production system. *Journal of Applied Phycology*, **30**(6) : 3603-3610.
- Laramore, S. E., P. S. Wills et M. D. Hanisak, 2022. Seasonal variation in the nutritional profile of *Ulva lactuca* produced in a land-based IMTA system. *Aquaculture International*, **30**(6) : 3067-3079.

- Lazzarotto, V., G. Corraze, A. Leprevost, E. Quillet, M. Dupont-Nivet et F. Médale, 2015. Three-year breeding cycle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant-based diet, totally free of marine resources: consequences for reproduction, fatty acid composition and progeny survival. *PLoS One*, **10**(2) : e0117609.
- Lech, G. P. et R. C. Reigh, 2012. Plant products affect growth and digestive efficiency of cultured Florida pompano (*Trachinotus carolinus*) fed compounded diets. *PLoS One*, **7**(4) : e34981.
- Lepage, G. et C.C. Roy, 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research*, **25**(12) : 1391-1396.
- Lund, I., S. J. Steinfeldt, K. Suhr et B. W. Hansen, 2008. A comparison of fatty acid composition and quality aspects of eggs and larvae from cultured and wild broodstock of common sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture Nutrition*, **14**(6) : 544-555.
- Main, K. L., N. Rhody, M. Nystrom et M. Resley, 2007. Species Profile: Florida Pompano (USDA SRAC Publication No. 7206). Southern Regional Aquaculture Center, Stoneville, MS.
- Marinho, G., C. Nunes, I. Sousa-Pinto, R. Pereira, P. Rema et L. M. Valente, 2013. The IMTA-cultivated Chlorophyta *Ulva spp.* as a sustainable ingredient in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets. *Journal of Applied Phycology*, **25**(5) : 1359-1367.
- Martínez-Antequera, F. P., J. A. Martos-Sitcha, J. M. Reyna et F. J. Moyano, 2021. Evaluation of the inclusion of the green seaweed *Ulva ohnoi* as an ingredient in feeds for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Animals*, **11**(6) : 1684.
- McMaster, M., 1988. Pompano culture: past success and present opportunities. *Aquaculture Magazine*, **14**(3) : 28-34.
- Mejri, S., 2016. Dynamique d'utilisation des nutriments durant l'embryogenèse chez le doré jaune (*Sander vitreus*) et le flétan du Groenland (*Reinhardtius hippoglossoides*) [Thèse de doctorat]. Université du Québec à Rimouski, 198 p.
- Mejri, S., R. Tremblay, G. Vandenberg et C. Audet, 2019. Novel feed from invasive species is beneficial to Walleye aquaculture. *North American Journal of Aquaculture*, **81**(1): 3-12.
- Mejri, S. C., R. Tremblay, C. Audet, P. S. Wills et M. Riche, 2021. Essential fatty acid requirements in tropical and cold-water marine fish larvae and juveniles. *Frontiers in Marine Science*, **8** : 1-15.
- Merino, G., M. Barange, J. L. Blanchard, J. Harle, R. Holmes, I. Allen, E. H. Allison, M. C. Badjeck, N. K. Dulvy et J. Holt, 2012. Can marine fisheries and aquaculture meet

- fish demand from a growing human population in a changing climate? *Global Environmental Change*, **22**(4) : 795-806.
- Moe, M. A., R. H. Lewis et R. M. Ingle, 1968. Pompano mariculture: Preliminary data and basic considerations. State of Florida Board of Conservation Technical Series No. 55. Florida Board of Conservation, Tallahassee, FL.
- Moreira, A., S. Cruz, R. Marques et P. Cartaxana, 2022. The underexplored potential of green macroalgae in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, **14**(1) : 5-26.
- Muller, R. G., K. Tisdell et M. D. Murphy, 2002. The 2002 update of the stock assessment of Florida pompano (*Trachinotus carolinus*). Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Marine Research Institute, St. Petersburg, FL.
- Murphy, M. D., R. G. Muller et K. Guindon, 2008. A stock assessment for pompano, *Trachinotus carolinus*, in Florida waters through 2005 (FWRI In House Report 2008-004). Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Marine Research Institute, St. Petersburg, FL.
- Mustafa, G., S. Wakamatsu, T.-A. Takeda, T. Umino et H. Nakagawa, 1995. Effects of algae meal as feed additive on growth, feed efficiency, and body composition in red sea bream. *Fisheries Science*, **61**(1) : 25-28.
- Nakagawa, H., 1993. Optimum level of *Ulva* meal diet supplement to minimize weight loss during wintering in black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*). *Asian Fisheries Science*, **6** : 139-148.
- Nakagawa, H., S. Kasahara et T. Sugiyama, 1987. Effect of *Ulva* meal supplementation on lipid metabolism of black sea bream, *Acanthopagrus schlegeli* (Bleeker). *Aquaculture*, **62**(2) : 109-121.
- Nandi, S. K., A. Y. Suma, A. Rashid, M. A. Kabir, K. W. Goh, Z. Abdul Kari, H. Van Doan, N. N. A. Zakaria, M. I. Khoo et L. Seong Wei, 2023. The potential of fermented water spinach meal as a fish meal replacement and the impacts on growth performance, reproduction, blood biochemistry and gut morphology of female stinging catfish (*Heteropneustes fossilis*). *Life*, **13**(1) : 176.
- Natify, W., M. Droussi, N. Berday, A. Araba et M. Benabid, 2015. Effect of the seaweed *Ulva lactuca* as a feed additive on growth performance, feed utilization and body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, **7**(3) : 85-92.
- Naylor, R. L., R. J. Goldburg, J. H. Primavera, N. Kautsky, M. C. Beveridge, J. Clay, C. Folke, J. Lubchenco, H. Mooney et M. Troell, 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, **405**(6790) : 1017-1024.

- Naylor, R. L., R. W. Hardy, A. H. Buschmann, S. R. Bush, L. Cao, D. H. Klinger, D. C. Little, J. Lubchenco, S. E. Shumway et M. Troell, 2021. A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, **591**(7851) : 551-563.
- Parrish, C. C., 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In M. T. Arts and B. C. Wainman (Eds.), *Lipids in Freshwater Ecosystems*, Springer, New York, USA, pp. 4-20. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0547-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0547-0_2)
- Parrish, C. C., 2013. Lipids in marine ecosystems. *International Scholarly Research Notices*, **2013** : 604045.
- Pereira, R., L. M. Valente, I. Sousa-Pinto et P. Rema, 2012. Apparent nutrient digestibility of seaweeds by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Algal Research*, **1**(1) : 77-82.
- Pickova, J., P. C. Dutta, P.-O. Larsson et A. Kiessling, 1997. Early embryonic cleavage pattern, hatching success, and egg-lipid fatty acid composition: comparison between two cod (*Gadus morhua*) stocks. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**(10) : 2410-2416.
- Rainuzzo, J. R., K. I. Reitan et Y. Olsen, 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, **155**(1-4) : 103-115.
- Riche, M., 2015. Nitrogen utilization from diets with refined and blended poultry by-products as partial fish meal replacements in diets for low-salinity cultured Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. *Aquaculture*, **435** : 458-466.
- Riche, M., F. T. Barrows, Z. Nilles, S. Mejri Chauffour, K. Campbell et P. S. Wills, 2023. Replacement of fish oil with a high DHA algal oil in a fishmeal-free diet fed to Florida pompano *Trachinotus carolinus*. *Frontiers in Aquaculture*, **2** : 1163542.
- Riley, K. L., C. R. Weirich et D. Cerino, 2009. Development and growth of hatchery-reared larval Florida pompano (*Trachinotus carolinus*). *Fishery Bulletin*, **107**(3): 318-328.
- Rønnestad, I. et H. J. Fyhn, 1993. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. *Reviews in Fisheries Science*, **1**(3) : 239-259.
- Rossi Jr, W. et D. A. Davis, 2012. Replacement of fishmeal with poultry by-product meal in the diet of Florida pompano *Trachinotus carolinus* L. *Aquaculture*, **338** : 160-166.
- Sargent, J., L. McEvoy, A. Estevez, G. Bell, M. Bell, J. Henderson et D. Tocher, 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, **179**(1-4) : 217-229.
- Shepherd, C. et A. Jackson, 2013. Global fishmeal and fish-oil supply: inputs, outputs and markets. *Journal of Fish Biology*, **83**(4) : 1046-1066.



- Shpigel, M., L. Guttman, L. Shauli, V. Odintsov, D. Ben-Ezra et S. Harpaz, 2017. *Ulva lactuca* from an integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) biofilter system as a protein supplement in gilthead seabream (*Sparus aurata*) diet. *Aquaculture*, **481** : 112-118.
- Silva, D., L. Valente, I. Sousa-Pinto, R. Pereira, M. Pires, F. Seixas et P. Rema, 2015. Evaluation of IMTA-produced seaweeds (*Gracilaria*, *Porphyra*, and *Ulva*) as dietary ingredients in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., juveniles. Effects on growth performance and gut histology. *Journal of Applied Phycology*, **27**(4) : 1671-1680.
- Stuart, K. R., L. Armbruster, R. Johnson et M. A. Drawbridge, 2020. Egg diameter as a predictor for egg quality of California yellowtail (*Seriola dorsalis*). *Aquaculture*, **522**: 735154.
- Tacon, A. G., 2018. Global trends in aquaculture and compound aquafeed production. *World Aquaculture*, **49**(2) : 33-46.
- Tatum, W. et W. Trimble, 1978. Monoculture and polyculture pond studies with pompano (*Trachinotus carolinus*) and penaeid shrimp (*Penaeus aztecus*, *P. duorarum*, and *P. setiferus*) in Alabama, 1975–1977. *Proceedings of the World Mariculture Society*, **9**: 433-446.
- Taynor, M. C., 2013. Evaluation of gross protein/energy ratios for adult Florida pompano, *Trachinotus carolinus*, fed practical diets, in relation to growth, feed utilization, and nitrogen retention [Mémoire de maîtrise]. University of Miami, 41 p.
- Tocher, D. R., 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, **41**(5) : 717-732.
- Turchini, G. M., B. E. Torstensen et W. K. Ng, 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, **1**(1) : 10-57.
- Valente, L., A. Gouveia, P. Rema, J. Matos, E. Gomes et I. Pinto, 2006. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, **252**(1) : 85-91.
- Wahbeh, M. I., 1997. Amino acid and fatty acid profiles of four species of macroalgae from Aqaba and their suitability for use in fish diets. *Aquaculture*, **159**(1-2) : 101-109.
- Wassef, E., M. El Masry et F. Mikhail, 2001. Growth enhancement and muscle structure of striped mullet, *Mugil cephalus* L., fingerlings by feeding algal meal-based diets. *Aquaculture Research*, **32** : 315-322.
- Wassef, E. A., A. F. M. El-Sayed, K. M. Kandeel et E. M. Sakr, 2005. Evaluation of *Pterocladia* (Rhodophyta) and *Ulva* (Chlorophyta) meals as additives to gilthead seabream *Sparus aurata* diets. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, **31** : 321-332.

- Wei, M., C. C. Parrish, N. I. Guerra, S. M. Tibbetts et S. M. Colombo, 2022. Dietary inclusion of a marine microalgae meal for Atlantic salmon (*Salmo salar*): Impact of Pavlova sp. 459 on growth performance and tissue lipid composition. *Aquaculture*, **553**: 738084.
- Weirich, C. R. et K. L. Riley, 2007. Volitional spawning of Florida pompano, *Trachinotus carolinus*, induced via administration of gonadotropin releasing hormone analogue (GnRH<sub>a</sub>). *Journal of Applied Aquaculture*, **19**(3) : 47-60.
- Weirich, C. R., K. L. Riley, M. Riche, K. L. Main, P. S. Wills, G. Illán, D. S. Cerino et T. J. Pfeiffer, 2021. The status of Florida pompano, *Trachinotus carolinus*, as a commercially ready species for US marine aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, **52** : 731-763.
- Wilke, T., S. Faulkner, L. Murphy, L. Kealy, S. Kraan et F. Brouns, 2015. Seaweed enrichment of feed supplied to farm-raised Atlantic salmon (*Salmo salar*) is associated with higher total fatty acid and LC n-3 PUFA concentrations in fish flesh. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **117**(6) : 767-772.
- Wills, P.S., C. Robinson, M. Riche, S. Snyder, M. Davis, G. Illan, C. Weirich, F. Perron, S. Mejri, L.E King, D.J. Bradshaw II, J. Masterson et S. Laramore, 2023. Culture manual for the Florida pompano *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). Florida Atlantic University's Harbor Branch Oceanographic Institute. URL: <https://www.fau.edu/hboi/research/aquaculture-innovation/center-for-marine-and-warm-water-aquaculture/education/pompano-aquaculture-industry-workshop-2023/>
- Xu, B.-T., S. Yamasaki et H. Hirata, 1993. Supplementary *Ulva sp.* var. meal level in diet of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Science*, **41**(4) : 461-468.
- Yıldırım, Ö., S. Ergün, S. Yaman et A. Türker, 2009. Effects of two seaweeds (*Ulva lactuca* and *Enteromorpha linza*) as a feed additive in diets on growth performance, feed utilization, and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **15**(3) : 455-460.
- Yúfera, M. et M. Darias, 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, **268**(1-4) : 53-63.
- Zakeri, M., P. Kochanian, J. G. Marammazi, V. Yavari, A. Savari et M. Haghi, 2011. Effects of dietary n-3 HUFA concentrations on spawning performance and fatty acids composition of broodstock, eggs and larvae in yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus*. *Aquaculture*, **310**(3-4) : 388-394.



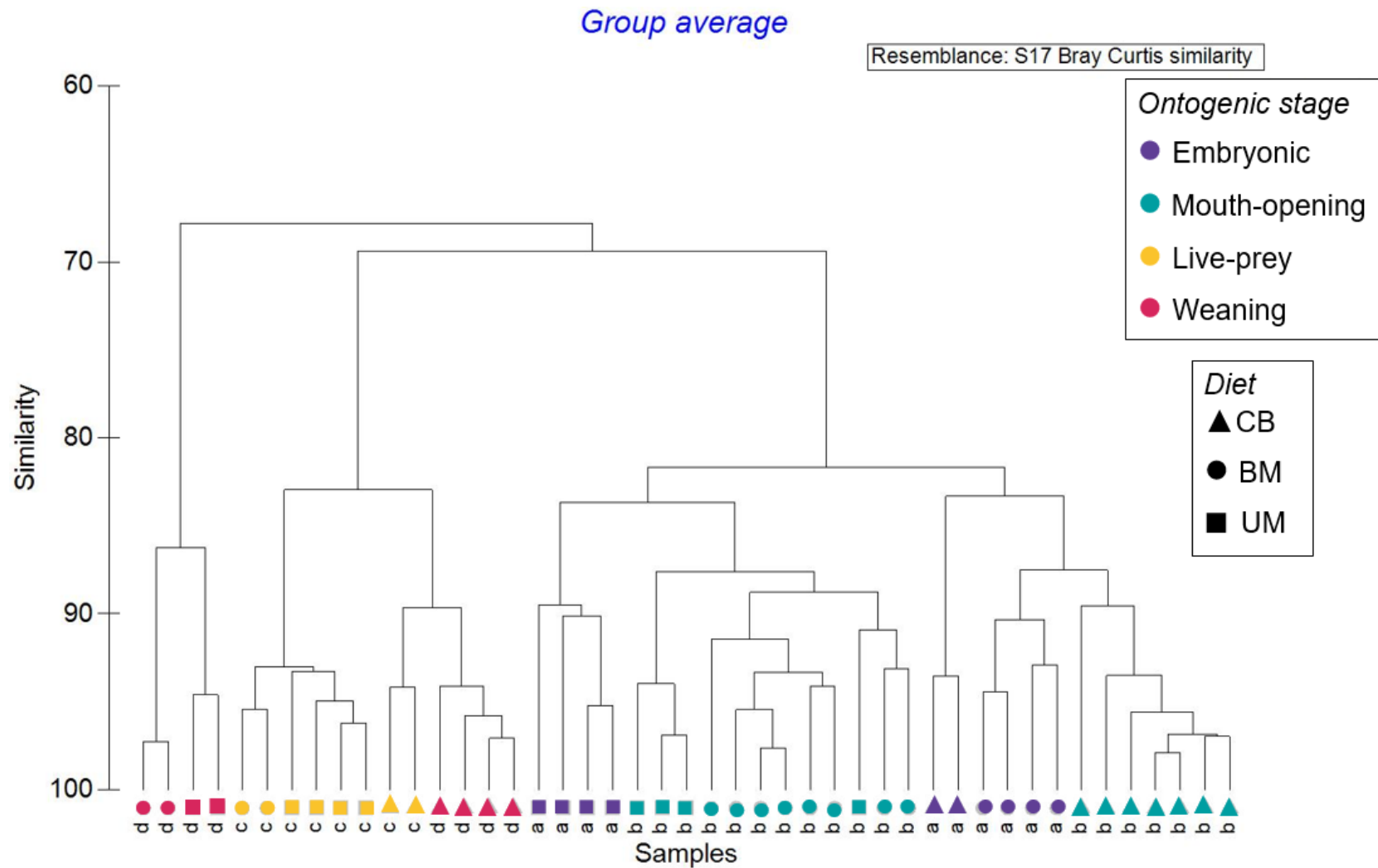
## ANNEXES

Annex I. Fatty acid composition of larvae (values as mean  $\pm$  SD with concentrations expressed as relative percentages of mass of total fatty acids (MTFA) for the 2, 13, and 15 DPH larvae from all diet treatments (control, Breed-M, and *Ulva*). The MTFA content was expressed in mg g<sup>-1</sup> and is shown at the bottom of the table with the ratios and the average similarity within each diet group. The main fatty acids contributing >10% to the differences in each DPH group (SIMPER outputs) are in bold and letters indicate significant differences between diets. Fatty acids contributing to less than 1 % were removed but added to the total SFA, MUFA, and PUFA. SFA: saturated FA; MUFA: monounsaturated FA; LA: linoleic acid; LNA: linolenic acid; ARA: arachidonic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; PUFA: polyunsaturated FA.

Fatty acid	2 DPH			13 DPH			15 DPH		
	Control n = 4	Breed-M n = 8	<i>Ulva</i> n = 4	Control n = 2	Breed-M n = 2	<i>Ulva</i> n = 2	Control No sample	Breed-M n = 2	<i>Ulva</i> n = 2
14:0	2.56 $\pm$ 0.22	1.54 $\pm$ 0.21	0.64 $\pm$ 0.08	0.87 $\pm$ 0.06	0.54 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.01		0	0.85 $\pm$ 0.16
16:0	<b>22.36 <math>\pm</math> 1.84</b>	<b>15.61 <math>\pm</math> 2.44</b>	<b>13.32 <math>\pm</math> 0.49</b>	<b>18.86 <math>\pm</math> 0.42</b>	7.97 $\pm$ 0.23	8.73 $\pm$ 0.28		5.89 $\pm$ 0.60	8.82 $\pm$ 0.25
17:0	0.51 $\pm$ 0.34	0.66 $\pm$ 0.08	0.37 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.03	0.84 $\pm$ 0.09	0.87 $\pm$ 0.08		1.52 $\pm$ 0.24	0.78 $\pm$ 0.06
18:0	6.75 $\pm$ 0.72	<b>9.75 <math>\pm</math> 0.72</b>	5.49 $\pm$ 0.43	<b>12.58 <math>\pm</math> 1.40</b>	8.72 $\pm$ 0.27	9.64 $\pm$ 0.10		<b>13.25 <math>\pm</math> 0.48</b>	9.05 $\pm$ 0.54
$\Sigma$ SFA <sup>a</sup>	32.92 $\pm$ 1.63 <sup>c</sup>	28.83 $\pm$ 2.02 <sup>b</sup>	20.56 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	33.99 $\pm$ 1.91	19.09 $\pm$ 0.43	20.87 $\pm$ 0.13		22.81 $\pm$ 0.68	20.42 $\pm$ 0.60
16:1	5.23 $\pm$ 0.48	3.97 $\pm$ 0.41	3.82 $\pm$ 0.36	1.16 $\pm$ 0.03	2.75 $\pm$ 0.21	3.40 $\pm$ 0.35		3.56 $\pm$ 0.58	3.60 $\pm$ 0.18
17:1	0	0.56 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.26	0.84 $\pm$ 0.06	1.26 $\pm$ 0.06	1.33 $\pm$ 0.18		1.17 $\pm$ 0.05	1.21 $\pm$ 0.09
18:1n9 (Z)	<b>28.88 <math>\pm</math> 1.60</b>	<b>23.28 <math>\pm</math> 1.62</b>	<b>23.78 <math>\pm</math> 2.29</b>	<b>17.50 <math>\pm</math> 0.06</b>	<b>14.52 <math>\pm</math> 1.64</b>	<b>14.92 <math>\pm</math> 0.06</b>		<b>16.84 <math>\pm</math> 0.26</b>	<b>12.58 <math>\pm</math> 0.08</b>
18:1n9 (E)	2.79 $\pm$ 1.95	2.20 $\pm$ 0.40	3.11 $\pm$ 0.19	2.12 $\pm$ 1.31	3.59 $\pm$ 1.58	4.15 $\pm$ 1.12		1.97 $\pm$ 0.33	3.16 $\pm$ 0.08
20:1	1.03 $\pm$ 0.31	4.96 $\pm$ 0.99	4.30 $\pm$ 0.46	1.62 $\pm$ 0.16	3.76 $\pm$ 0.38	1.56 $\pm$ 0.04		4.42 $\pm$ 1.10	2.34 $\pm$ 0.24
22:1	0	0.86 $\pm$ 0.24	0	0	0.42 $\pm$ 0.00	0.40 $\pm$ 0.02		1.35 $\pm$ 0.08	0.74 $\pm$ 0.27
24:1	0.65 $\pm$ 0.45	0.67 $\pm$ 0.09	1.02 $\pm$ 0.12	0.18 $\pm$ 0.26	0.29 $\pm$ 0.06	0.30 $\pm$ 0.08		0.30 $\pm$ 0.00	0.35 $\pm$ 0.06
$\Sigma$ MUFA <sup>b</sup>	38.59 $\pm$ 1.24	36.50 $\pm$ 2.63	36.25 $\pm$ 3.01	23.43 $\pm$ 1.58	26.58 $\pm$ 0.65	26.07 $\pm$ 0.71		29.61 $\pm$ 1.06	23.97 $\pm$ 1.00
18:2n6 (LA)	5.40 $\pm$ 0.33	8.38 $\pm$ 1.42	<b>11.50 <math>\pm</math> 1.06</b>	6.18 $\pm$ 0.21	9.38 $\pm$ 0.18	9.24 $\pm$ 0.07		<b>11.09 <math>\pm</math> 0.85</b>	9.41 $\pm$ 0.75
18:3n3 (LNA)	1.79 $\pm$ 0.22	1.03 $\pm$ 0.21	1.13 $\pm$ 0.11	<b>28.89 <math>\pm</math> 1.07</b>	<b>28.73 <math>\pm</math> 0.08</b>	<b>26.37 <math>\pm</math> 0.76</b>		<b>18.60 <math>\pm</math> 5.13</b>	<b>25.96 <math>\pm</math> 3.85</b>
20:4n6 (ARA)	0.60 $\pm$ 0.42	1.85 $\pm$ 0.31	1.18 $\pm$ 0.03	0.59 $\pm$ 0.06	1.74 $\pm$ 0.14	1.80 $\pm$ 0.17		2.65 $\pm$ 0.50	1.77 $\pm$ 0.00
20:3	0	0	0	2.65 $\pm$ 0.35	2.79 $\pm$ 0.13	3.12 $\pm$ 0.16		3.54 $\pm$ 0.51	3.74 $\pm$ 0.36
20:5n3 (EPA)	5.28 $\pm$ 0.62	2.95 $\pm$ 0.36	2.80 $\pm$ 0.15	1.72 $\pm$ 0.12	5.20 $\pm$ 0.57	6.21 $\pm$ 0.45		5.72 $\pm$ 1.01	6.88 $\pm$ 1.26
22:6n3 (DHA)	<b>14.94 <math>\pm</math> 0.27</b>	<b>19.93 <math>\pm</math> 1.84</b>	<b>26.11 <math>\pm</math> 2.69</b>	2.07 $\pm$ 0.04	4.64 $\pm$ 0.02	4.40 $\pm$ 0.23		4.40 $\pm$ 0.32	6.23 $\pm$ 0.65
$\Sigma$ PUFA <sup>b</sup>	28.50 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	34.67 $\pm$ 3.39 <sup>b</sup>	43.19 $\pm$ 2.72 <sup>c</sup>	42.58 $\pm$ 0.32	54.33 $\pm$ 1.08	53.06 $\pm$ 0.58		47.58 $\pm$ 1.74	55.60 $\pm$ 1.60
$\omega$ -3/ $\omega$ -6	3.71 $\pm$ 0.47 <sup>c</sup>	2.37 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	2.39 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	5.23 $\pm$ 0.30	3.34 $\pm$ 0.01	3.25 $\pm$ 0.19		2.26 $\pm$ 0.47	3.51 $\pm$ 0.37
EPA/ARA	4.80 $\pm$ 3.26 <sup>c</sup>	1.62 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	2.36 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	2.95 $\pm$ 0.09	2.98 $\pm$ 0.08	3.47 $\pm$ 0.57		2.16 $\pm$ 0.03	3.89 $\pm$ 0.72
DHA/EPA	2.86 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	6.82 $\pm$ 0.68 <sup>b</sup>	9.36 $\pm$ 1.10 <sup>c</sup>	1.21 $\pm$ 0.10	0.90 $\pm$ 0.10	0.71 $\pm$ 0.01		0.78 $\pm$ 0.08	0.91 $\pm$ 0.07
MTFA	4.20 $\pm$ 0.43	9.26 $\pm$ 1.96	11.78 $\pm$ 4.19	6.26 $\pm$ 0.29	14.02 $\pm$ 2.01	18.11 $\pm$ 1.92		12.95 $\pm$ 2.33	18.20 $\pm$ 2.77
Average similarity (%)		93.43			96.10			92.31	

$\alpha$ : includes 12:0, 15:0, 20:0 and 22:0

$\delta$ : includes 18:3n6, 20:2, 20:3n6



Annex II. Hierarchical cluster dendrogram based on Brady and Curtis similarity index with values showing the relation of total FA composition of egg and larvae obtained from different diet treatments (CB for control diet; BM for Breed-M and UM for *Ulva* meal) and different ontogenic stages (embryonic (letter “a”), mouth-opening (letter “b”), live-prey (letter “c”) and weaning (letter “d”)).

Annex III. Fatty acid composition of larval diets (values as mean  $\pm$  SD with concentrations expressed as relative percentages of mass of total fatty acids (MTFA) fed to the *T. carolinus* larvae. The MTFA content was expressed in mg g<sup>-1</sup> and is shown at the bottom of the table with the ratios within each diet group (MTFA for Otohime C2 had n=2). The main fatty acids contributing >10% to the differences in each group (SIMPER outputs) are in bold and letters indicate significant differences between diets. Fatty acids contributing to less than 1 % were removed but added to the total SFA, MUFA, and PUFA. SFA: saturated FA; MUFA: monounsaturated FA; LA: linoleic acid; LNA: linolenic acid; ARA: arachidonic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; PUFA: polyunsaturated FA.

Fatty acid	Rotifer n = 3	Enriched rotifer n = 3	<i>Artemia</i> n = 3	Enriched <i>Artemia</i> n = 3	Otohime B1 n = 3	Otohime B2 n = 3	Otohime C1 n = 3	Otohime C2 n = 3
14:0	1.87 $\pm$ 0.22	1.18 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.10	3.76 $\pm$ 0.51	4.54 $\pm$ 1.05	4.17 $\pm$ 0.42	5.22 $\pm$ 1.04
16:0	<b>11.82 <math>\pm</math> 0.84</b>	<b>10.61 <math>\pm</math> 0.54</b>	<b>12.16 <math>\pm</math> 0.76</b>	7.92 $\pm$ 0.95	<b>11.97 <math>\pm</math> 0.43</b>	<b>12.93 <math>\pm</math> 0.52</b>	<b>13.65 <math>\pm</math> 1.66</b>	<b>16.35 <math>\pm</math> 1.59</b>
18:0	6.45 $\pm$ 0.70	4.80 $\pm$ 0.20	8.00 $\pm$ 0.36	7.12 $\pm$ 0.63	3.36 $\pm$ 0.34	3.28 $\pm$ 0.03	4.08 $\pm$ 0.16	3.97 $\pm$ 0.23
$\Sigma$ SFA <sup><math>\alpha</math></sup>	21.69 $\pm$ 1.85	17.81 $\pm$ 0.88	21.99 $\pm$ 1.24	17.31 $\pm$ 1.79	20.04 $\pm$ 1.33	21.77 $\pm$ 1.66	22.60 $\pm$ 2.36	26.33 $\pm$ 3.12
16:1	<b>16.86 <math>\pm</math> 1.31</b>	8.50 $\pm$ 0.99	2.49 $\pm$ 0.18	4.07 $\pm$ 0.31	6.65 $\pm$ 0.93	6.60 $\pm$ 0.51	6.83 $\pm$ 0.46	6.07 $\pm$ 0.28
17:1	0.83 $\pm$ 0.10	0.57 $\pm$ 0.04	1.66 $\pm$ 0.05	1.63 $\pm$ 0.09	0.29 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.05	0.30 $\pm$ 0.06	0.19 $\pm$ 0.16
18:1n9 (Z)	7.88 $\pm$ 0.38	7.34 $\pm$ 0.43	<b>14.92 <math>\pm</math> 0.48</b>	<b>11.56 <math>\pm</math> 3.10</b>	8.42 $\pm$ 0.39	8.25 $\pm$ 0.63	8.69 $\pm$ 0.54	8.34 $\pm$ 0.96
18:1n9 (E)	1.43 $\pm$ 0.17	1.10 $\pm$ 0.04	2.31 $\pm$ 0.25	3.59 $\pm$ 0.54	2.01 $\pm$ 0.28	1.92 $\pm$ 0.32	2.09 $\pm$ 0.17	2.07 $\pm$ 0.05
20:1	5.43 $\pm$ 0.20	4.22 $\pm$ 0.19	2.09 $\pm$ 0.24	3.01 $\pm$ 0.16	6.31 $\pm$ 0.39	6.75 $\pm$ 0.47	5.81 $\pm$ 0.30	6.87 $\pm$ 0.21
22:1	1.86 $\pm$ 0.15	1.34 $\pm$ 0.11	0.24 $\pm$ 0.22	0.86 $\pm$ 0.24	4.74 $\pm$ 0.36	5.44 $\pm$ 0.50	4.00 $\pm$ 0.13	4.55 $\pm$ 0.10
$\Sigma$ MUFA <sup><math>\beta</math></sup>	34.77 $\pm$ 2.38	23.79 $\pm$ 1.84	23.71 $\pm$ 1.42	25.04 $\pm$ 4.45	29.27 $\pm$ 2.40	30.12 $\pm$ 2.53	28.51 $\pm$ 1.69	28.90 $\pm$ 1.77
18:2n6 (LA)	7.80 $\pm$ 0.86	<b>14.30 <math>\pm</math> 0.24</b>	8.08 $\pm$ 0.39	9.24 $\pm$ 0.41	6.39 $\pm$ 0.64	6.05 $\pm$ 0.34	4.70 $\pm$ 0.72	4.27 $\pm$ 0.18
18:3n3 (LNA)	0.57 $\pm$ 0.04	2.59 $\pm$ 0.44	<b>35.66 <math>\pm</math> 1.52</b>	<b>23.81 <math>\pm</math> 2.24</b>	1.14 $\pm$ 0.12	1.05 $\pm$ 0.07	1.15 $\pm$ 0.03	1.34 $\pm$ 0.21
20:4n6 (ARA)	5.40 $\pm$ 0.25	4.30 $\pm$ 0.69	0.41 $\pm$ 0.12	2.32 $\pm$ 0.10	0.85 $\pm$ 0.12	0.78 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.09	0.83 $\pm$ 0.07
20:3	1.98 $\pm$ 0.17	1.36 $\pm$ 0.28	4.91 $\pm$ 0.22	1.83 $\pm$ 0.09	0.05 $\pm$ 0.09	0	0	0
20:5n3 (EPA)	<b>26.63 <math>\pm</math> 2.16</b>	<b>17.20 <math>\pm</math> 1.13</b>	1.93 $\pm$ 0.07	<b>12.46 <math>\pm</math> 1.60</b>	<b>25.53 <math>\pm</math> 1.42</b>	<b>23.21 <math>\pm</math> 1.88</b>	<b>24.80 <math>\pm</math> 3.15</b>	<b>20.93 <math>\pm</math> 1.12</b>
22:6n3 (DHA)	0	<b>17.47 <math>\pm</math> 0.34</b>	0	6.63 $\pm$ 0.32	<b>16.43 <math>\pm</math> 0.24</b>	<b>16.72 <math>\pm</math> 0.87</b>	<b>17.17 <math>\pm</math> 0.29</b>	<b>17.03 <math>\pm</math> 1.16</b>
$\Sigma$ PUFA <sup><math>\delta</math></sup>	42.95 $\pm$ 3.58	58.04 $\pm$ 3.15	51.38 $\pm$ 2.36	56.77 $\pm$ 4.79	50.60 $\pm$ 1.66	48.04 $\pm$ 3.20	48.79 $\pm$ 4.31	44.65 $\pm$ 2.75
$\omega$ -3/ $\omega$ -6	2.06 $\pm$ 0.15	2.00 $\pm$ 0.09	4.43 $\pm$ 0.31	3.71 $\pm$ 0.18	5.97 $\pm$ 0.59	6.02 $\pm$ 0.44	8.02 $\pm$ 1.47	7.73 $\pm$ 0.67
EPA/ARA	4.93 $\pm$ 0.18	4.10 $\pm$ 0.92	4.99 $\pm$ 1.66	5.37 $\pm$ 0.63	30.25 $\pm$ 3.57	29.93 $\pm$ 2.43	32.53 $\pm$ 2.47	25.49 $\pm$ 3.28
DHA/EPA	0	1.02 $\pm$ 0.09	0	0.54 $\pm$ 0.07	0.64 $\pm$ 0.03	0.72 $\pm$ 0.06	0.70 $\pm$ 0.09	0.81 $\pm$ 0.06
MTFA	52.08 $\pm$ 4.00	86.44 $\pm$ 13.88	75.66 $\pm$ 9.74	87.57 $\pm$ 12.60	164.10 $\pm$ 12.00	171.41 $\pm$ 7.97	207.31 $\pm$ 16.72	190.67 $\pm$ 3.95
Average similarity (%)	94.86	96.16	96.69	92.72	95.85	95.23	94.74	95.15

$\alpha$ : includes 12:0, 15:0, 20:0 and 22:0

$\beta$ : includes 24:1

$\delta$ : includes 18:3n6, 20:2, 20:3n6



