

**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA**

**ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA**

**INGENIERO AGRÓNOMO**



**PROYECTO FIN DE CARRERA**

**EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DEL PROBIÓTICO *Shewanella*  
pdp 11 EN JUVENILES DE LENGUADO SENEGALÉS (*Solea*  
*senegalensis*, KAUP 1858) Y DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA SU  
MICROENCAPSULACIÓN**

**ALUMNO:**

**TUTORES:**

**DAVID MARTÍNEZ SÁEZ**

**FRANCISCO JAVIER ALARCÓN LÓPEZ**

**ANA RODILES GUERRERO**

**ALMERÍA, JULIO 2011**



## ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>9</b>
1.1. SITUACIÓN GENERAL DE LA PESCA Y LA ACUICULTURA.....	10
1.2. BIOLOGÍA DE <i>Solea senegalensis</i> .....	12
1.3. EL CULTIVO DE <i>S. senegalensis</i> .....	13
1.3.1. Evolución del cultivo de <i>S. senegalensis</i> .....	14
1.3.2. Situación actual del cultivo de <i>S. senegalensis</i> .....	15
1.4. LOS PROBIÓTICOS EN LA ACUÍCULTURA.....	17
1.4.1. Probióticos en lenguado senegalés.....	18
1.4.2. Mecanismos de acción de <i>Shewanella putrefaciens</i> .....	19
1.4.2.1. <i>Respuesta inmune</i> .....	19
1.4.2.2. <i>Efectos gastrointestinales</i> .....	19
1.4.2.3. <i>Efectos en la nutrición</i> .....	20
1.4.2.4. <i>Resistencia a enfermedades</i> .....	21
1.4.3. Administración del probiótico pdp11.....	22
1.4.3.1. <i>Microencapsulación</i> .....	22
1.5. INDICADORES DE CONDICIÓN EN PECES.....	24
1.5.1. El sistema inmune en los peces.....	24
1.5.2. Las enzimas digestivas como indicadoras del estado de condición.....	25
1.5.2.1. <i>Proteasas</i> .....	26
1.5.2.2. <i>Fosfatasa ácida y alcalina</i> .....	27
<b>2. INTERÉS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>

3.1. EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL EFECTO DEL PROBIÓTICO INACTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA FISIOLÓGÍA DE JUVENILES DE LENGUADO SENEGALÉS.	32
3.1.1. Acondicionamiento del laboratorio húmedo.	32
3.1.2. Cultivo del probiótico.	34
3.1.3. Preparación de los piensos experimentales.	34
3.1.4. Aclimatación y manejo de los peces.	36
3.1.5. Toma de muestras.	36
3.1.6. Determinación de parámetros zootécnicos.	37
3.1.7. Análisis del estado inmune inespecífico de los peces.	39
3.1.8. Análisis de otros parámetros sanguíneos.	41
3.1.9. Determinación de actividades enzimáticas digestivas.	42
3.2. OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA ELABORAR MICROCÁPSULAS QUE INCLUYAN AL PROBIÓTICO.	45
3.2.1. Método de microencapsulación.	45
3.2.2. Morfología de las cápsulas.	46
3.2.3. Influencia de la concentración de alginato.	46
3.2.4. Influencia de la concentración de cloruro cálcico.	47
3.2.5. Estabilidad de las cápsulas a temperatura ambiente y a 4 °C.	47
3.2.6. Estabilidad de las cápsulas en una disolución de cloruro sódico.	47
3.2.7. Capacidad de carga de las cápsulas.	47
3.2.8. Conservación de las cápsulas.	47
3.2.9. Ensayo de digestibilidad <i>in vitro</i> .	48
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	48
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>49</b>
4.1. EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL EFECTO DEL PROBIÓTICO INACTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO Y FISIOLÓGÍA DE JUVENILES DE LENGUADO SENEGALÉS. ...	50
4.1.1. Evolución del crecimiento de los peces.	50

4.1.2. Evaluación del estado inmune de los peces. ....	54
4.1.2.1. <i>Evaluación de los metabolitos plasmáticos y del hematocrito.</i> .....	57
4.1.3. Evaluación de las actividades enzimáticas digestivas.....	58
<b>4.2. OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA ELABORAR MICROCÁPSULAS QUE INCLUYAN AL PROBIÓTICO.</b> .....	<b>60</b>
4.2.1. Caracterización morfológica de las microcápsulas. ....	60
4.2.2. Optimización del proceso de encapsulación. ....	63
4.2.3. Evaluación de la capacidad de carga de las microcápsulas.....	65
4.2.4. Estabilidad de las microcápsulas en condiciones de almacenamiento. ....	65
4.2.5. Supervivencia de las bacterias encapsuladas en condiciones digestivas simuladas. .....	68
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>73</b>
5.1. EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL EFECTO DEL PROBIÓTICO INACTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO Y FISIOLÓGÍA DE JUVENILES DE LENGUADO SENEGALÉS. ....	74
5.1.1. Evolución del crecimiento de los peces. ....	74
5.1.2. Evaluación del estado inmune de los peces. ....	76
5.1.2.1. <i>Evaluación de los metabolitos plasmáticos y del hematocrito.</i> .....	78
5.1.3. Evaluación de las actividades enzimáticas digestivas.....	79
5.2. OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA ELABORAR MICROCÁPSULAS QUE INCLUYAN AL PROBIÓTICO. ....	81
5.2.1. Caracterización morfológica de las microcápsulas. ....	81
5.2.2. Optimización del proceso de encapsulación. ....	81
5.2.3. Evaluación de la capacidad de carga de las microcápsulas.....	82
5.2.4. Estabilidad de las microcápsulas en condiciones de almacenamiento. ....	83
5.2.5. Supervivencia de las bacterias encapsuladas en condiciones digestivas simuladas. .....	84
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>86</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>88</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Utilización y suministro mundiales de pescado (FAO 2008) .....	11
<b>Figura 2.</b> Evolución de los principales grupos de especies producidos en acuicultura (FAO 2008). .....	12
<b>Figura 3.</b> Detalle de la morfología de ejemplares adultos de <i>S. senegalensis</i> (A) y <i>S. solea</i> (B) .....	13
<b>Figura 4.</b> Ejemplares de <i>S. senegalensis</i> en piscifactoría.....	17
<b>Figura 5.</b> Reacción química entre el alginato y el calcio, y formación de la estructura de "caja de huevos". .....	24
<b>Figura 6.</b> Detalle del laboratorio húmedo. (A)Tanques experimentales, (B) lámpara de ultravioleta y (C) filtro biológico.....	33
<b>Figura 7.</b> Sistema cerrado utilizado para el ensayo de alimentación con ejemplares juveniles de <i>S. senegalensis</i> .....	34
<b>Figura 8.</b> Evolución del peso fresco de los peces (A) e incremento de biomasa en los tanques (B) a lo largo del periodo experimental. Los valores muestran la media $\pm$ d.e. (n = 16). En un mismo día, los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).....	51
<b>Figura 9.</b> Evolución de la longitud de los peces a lo largo del periodo experimental. Los valores muestran la media $\pm$ d.e. (n = 16). En un mismo día, los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ). .....	52
<b>Figura 10.</b> Concentración plasmática de proteína soluble de los ejemplares de lenguado senegalés al final del periodo experimental. Los valores muestran la media $\pm$ d.e. (n = 16). Los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo día ( $p < 0,05$ ). .....	55
<b>Figura 11.</b> Concentración plasmática de inmunoglobulinas totales de los ejemplares de lenguado senegalés al final del periodo experimental. Los valores muestran la media $\pm$ d.e. (n = 16). Los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo día ( $p < 0,05$ ). .....	56
<b>Figura 12.</b> Actividad antritripsina (expresada en % de inhibición sobre una tripsina comercial de referencia) cuantificada en el plasma (azul) y suero (marrón) de los ejemplares de lenguado senegalés al final del periodo experimental. Los valores muestran la media $\pm$ d.e. (n = 16). Los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo día ( $p < 0,05$ ). .....	56

<b>Figura 13.</b> Actividades fosfatasa alcalina (A) y lisozima (B) en el plasma de los ejemplares de lenguado senegalés al final de experimento. Los valores muestran la media $\pm$ d.e. (n = 16). Los valores con diferentes índices indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo día ( $p < 0,05$ ). .....	57
<b>Figura 14.</b> Actividad bactericida del suero (expresada como recuento de bacterias viables de un inóculo de referencia, expresado en $\log_{10}$ UFC) de los ejemplares de lenguado senegalés al final del experimento. Los valores muestran la media $\pm$ d.e. (n = 16). Los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo día ( $p < 0,05$ ) .....	58
<b>Figura 15.</b> Detalle de microcápsulas de alginato al microscopio óptico. (Barra de escala = 200 $\mu$ m. Aumentos x 200) .....	61
<b>Figura 16.</b> Detalle de microcápsulas al microscopio electrónico: microcápsula de alginato hidratada (A), sección transversal de una microcápsula de alginato-quitosano con detalle de la cubierta (B), y detalle de las bacterias en el interior de las cápsulas deshidratadas y metalizadas con oro (C y D). Aumentos: A y B (x 40), C (x 1500) y D (x 2500). .....	62
<b>Figura 17.</b> Histograma de distribución de tamaños (longitud del eje mayor en $\mu$ m) en una muestra de 200 microcápsulas. Los valores muestran el porcentaje de partículas en cada intervalo de tamaños. ....	63
<b>Figura 18.</b> Influencia de la concentración de alginato sódico en el rendimiento de encapsulación. Los valores muestran la media $\pm$ d.e. (n = 3). Los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) .....	65
<b>Figura 19.</b> Influencia de la concentración de cloruro cálcico en el rendimiento de encapsulación. Los valores muestran la media $\pm$ d.e. (n = 3). Los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) .....	65
<b>Figura 20.</b> Capacidad de carga de las microcápsulas de alginato y alginato-quitosano. Los valores muestran la media $\pm$ d.e. (n = 3). Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para un mismo tipo de microcápsulas elaboradas con inóculos que contienen distinta concentración de bacterias (minúsculas) o entre los dos tipos de microcápsulas para una misma concentración de células en el inóculo (mayúsculas) .....	66
<b>Figura 21.</b> Evolución de la viabilidad de las bacterias probióticas en las microcápsulas de alginato (A) y de alginato-quitosano (B).almacenadas a temperatura ambiente o a 4 °C. Los valores muestran la media $\pm$ d.e. (n = 3). Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para un mismo tipo de microcápsulas a lo largo del tiempo (minúsculas) o entre los dos tipos de microcápsulas para un mismo día (mayúsculas) .....	67

- Figura 22.** Estabilidad de las microcápsulas en solución salina. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 3$ ). Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para un mismo parámetro a lo largo del tiempo ..... 68
- Figura 23.** Evolución de la viabilidad de las células probióticas encapsuladas en microcápsulas de alginato (A) y alginato-quitosano (B) bajo condiciones estomacales (pH ácido) de pez simuladas. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 3$ ) del % de bacterias viables respecto al valor inicial de células encapsuladas. Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para un mismo valor de pH a lo largo del tiempo (minúsculas) o a diferentes valores de pH para un mismo tiempo (mayúsculas) ..... 70
- Figura 24.** Evolución de la viabilidad de las células probióticas encapsuladas en microcápsulas de alginato (A) y alginato-quitosano (B) bajo condiciones intestinales (pH alcalino) de pez simuladas. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 3$ ) del % de bacterias viables respecto al valor inicial de células encapsuladas. Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para un mismo valor de pH a lo largo del tiempo (minúsculas) o a diferentes valores de pH para un mismo tiempo (mayúsculas) ..... 71
- Figura 25.** Evolución de la viabilidad de las células probióticas encapsuladas en microcápsulas de alginato (A) y alginato-quitosano (B) durante una simulación digestiva secuencial (fase ácida seguido otra alcalina). Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 3$ ) del % de bacterias respecto al valor inicial. Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para un mismo valor de pH a lo largo del tiempo (minúsculas) o a diferentes valores de pH para un mismo tiempo (mayúsculas) ..... 72



## *ÍNDICE DE TABLAS*

<b>Tabla 1.</b> Formulación de los piensos experimentales utilizados en el ensayo. ....	36
<b>Tabla 2.</b> Composición química de los piensos experimentales utilizados en el ensayo.....	36
<b>Tabla 3.</b> Parámetros zootécnicos y de aprovechamiento nutritivo de los ejemplares juveniles de lenguado senegalés alimentados con los piensos experimentales.....	53
<b>Tabla 4.</b> Índices morfométricos de los ejemplares juveniles de lenguado senegalés alimentados con los piensos experimentales durante 52 días .....	54
<b>Tabla 5.</b> Composición proximal (% en base seca) y humedad de los peces al final del experimento.....	54
<b>Tabla 6.</b> Concentración de colesterol y triglicéridos en el plasma sanguíneo, y valores del hematocrito de los ejemplares de lenguado senegalés al final del experimento.....	59
<b>Tabla 7.</b> Actividades enzimáticas digestivas determinadas en los extractos estomacales e intestinales de los ejemplares juveniles de lenguado senegalés al final del experimento.....	60
<b>Tabla 8.</b> Resultados del estudio del tamaño y morfología de las microcápsulas.....	64
<b>Tabla 9.</b> Evolución de la viabilidad de las bacterias probióticas en las microcápsulas con distintos procedimientos de conservación.....	69

## *1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

## 1.1. SITUACIÓN GENERAL DE LA PESCA Y LA ACUICULTURA.

La producción mundial de la pesca y la acuicultura suministró alrededor de 142 millones de toneladas de pescado en 2008, de los cuales 115 se destinaron al consumo humano, según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (Figura 1). Esto equivale a un suministro per cápita aparente de 17 kg, lo cual constituye un máximo histórico. La acuicultura aportó a este valor total un 46 %, lo que supone un incremento constante del 43 % desde 2006, derivándose cerca de 53 millones de toneladas de pescado de esta actividad (FAO, 2010).

En 2007 el pescado representó el 15,7 % del aporte de proteínas animales de la población mundial y el 6,1 % de todas las proteínas consumidas. El suministro per cápita medio anual aparente de pescado en los países en desarrollo fue de 15,1 kg y de 14,4 kg en los países de bajos ingresos y con déficit de alimentos. En estos países, donde el consumo de proteínas animales es relativamente bajo, el pescado aportó el 20 % o más del total de proteínas, debido a la dificultad de registrar la pesca en pequeña escala y de subsistencia (FAO, 2010).

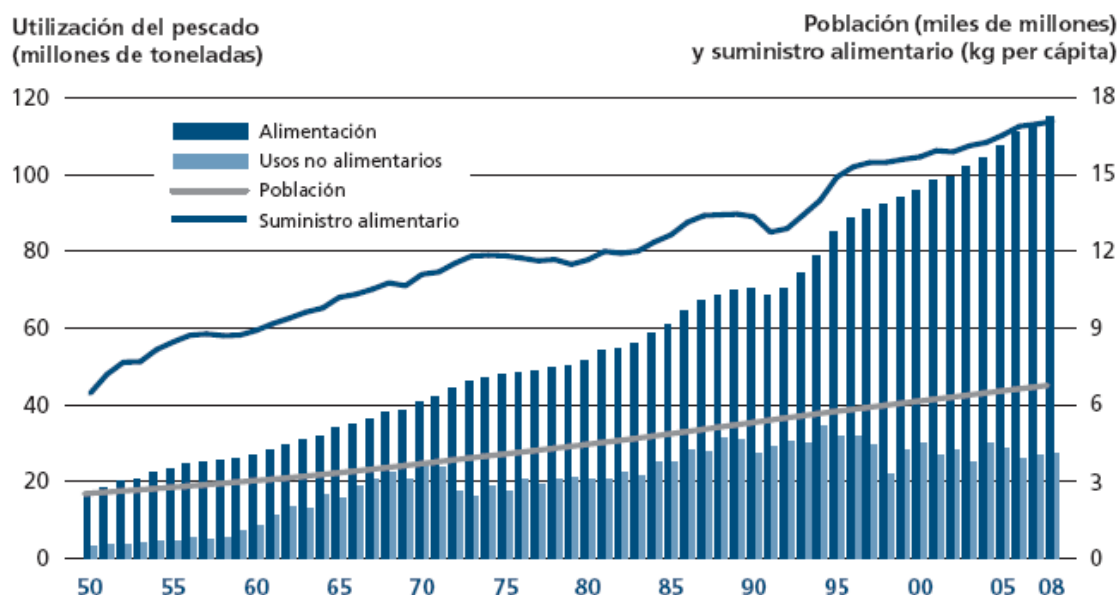
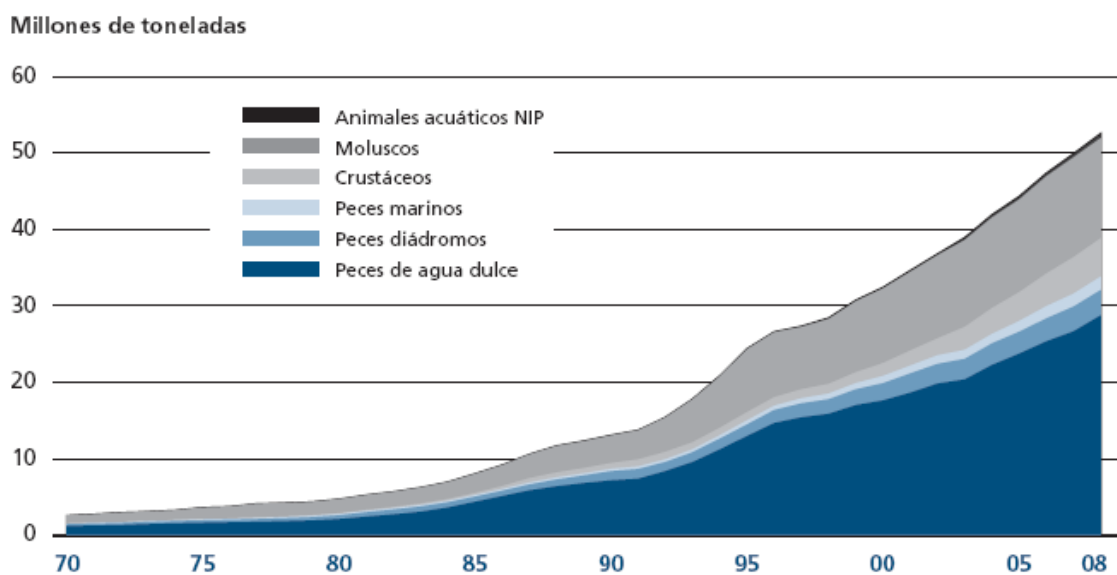


Figura 1. Utilización y suministro mundiales de pescado (FAO 2008).

La producción mundial de la pesca de captura se ha mantenido relativamente estable en la última década, con excepción de algunas fluctuaciones debidas a las capturas de especies muy susceptibles a fenómenos como El Niño. En 2005, por ejemplo, las capturas totales de las

especies marinas se redujeron cerca de 1 millón de toneladas. Se estimó en 2008 que alrededor del 32 % de los caladeros mundiales se encontraban sobreexplotados o agotados. Además, la mitad de las poblaciones mundiales de peces estaban plenamente explotadas, produciendo capturas en sus límites máximos sostenibles.

Este estancamiento en las capturas se ve compensado con la producción acuícola. La acuicultura sigue creciendo más rápidamente que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal, y a mayor ritmo que la población, esperándose que supere a la pesca de captura como fuente de pescado comestible (Figura 2). El suministro acuícola per cápita se ha incrementado desde 0,7 kg en 1970 hasta 7,8 kg en 2008, lo que constituye un crecimiento medio anual del 6,6 %. Mientras que a comienzos de la década de 1950 la producción acuícola (a excepción de las plantas acuáticas) era inferior a 1 millón de toneladas anuales, en 2008 ascendió a 52,5 millones de toneladas con un valor de 98 400 millones de USD (FAO, 2010).



Nota: NIP = no incluidos en otra parte.

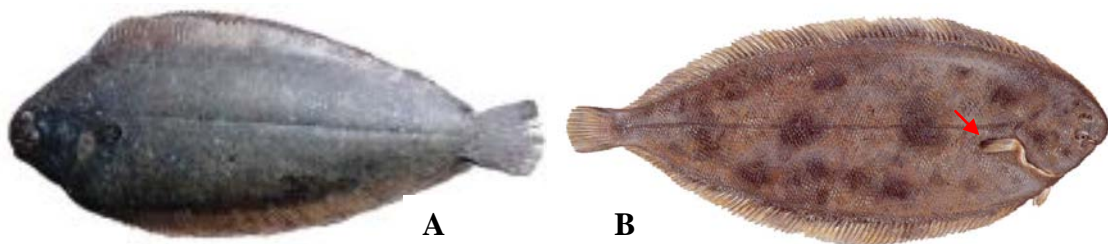
**Figura 2.** Evolución de los principales grupos de especies producidos en acuicultura (FAO 2008).

En España, la piscicultura marina se empezó a desarrollar a partir de los años 80 con el cultivo del rodaballo en el Cantábrico y Galicia y, lubina y dorada en el Mediterráneo y zona Sur-Atlántica. A pesar de tener una historia relativamente reciente, la piscicultura marina se ha caracterizado desde sus inicios por la búsqueda de nuevas especies susceptibles de ser producidas industrialmente. Se han emprendido numerosas investigaciones dirigidas a conocer las opciones de cultivo de un gran número de especies, estudiándose en el área

mediterránea, las posibilidades de más de treinta especies (Divanach, 2003). A pesar de estos estudios, la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y la dorada (*Sparus aurata*) siguen dominando la acuicultura marina en España, sin embargo, el rápido crecimiento de la producción y la saturación del mercado de estas especies ha propiciado la búsqueda de nuevos candidatos para la acuicultura marina (Cañavate, 2005), como el lenguado senegalés, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858).

## 1.2. BIOLOGÍA DE *Solea senegalensis*.

El lenguado senegalés, *Solea senegalensis*, es un pez plano de la familia de los Soleidos, en el orden de los pleuronectiformes. *S. senegalensis* se distribuye por la costa Oeste africana y la costa europea del Atlántico y Mediterráneo Occidental. Se trata de una especie de alto valor comercial que tradicionalmente se ha cultivado de forma extensiva en España y Portugal (Dinis *et al.*, 1999). *S. senegalensis* es un pez plano, con el cuerpo ovalado y asimétrico (Figura 3). Tras la metamorfosis los dos ojos se sitúan en el lado derecho. El pedúnculo caudal está unido al último radio de la aleta dorsal y de la anal por una membrana muy baja. La coloración de la cara ocular es generalmente gris parduzca con numerosas manchas azuladas, mientras que la cara ciega presenta una coloración más clara. La aleta pectoral de la cara ocular es de color negro, lo que lo distingue de *S. solea*, que posee una mancha negra en la parte posterior de esta aleta (flecha roja).



**Figura 3.** Detalle de la morfología de ejemplares adultos de *S. senegalensis* (A) y *S. solea* (B).

Es una especie gonocórica y la maduración sexual se alcanza con una talla de 30 cm (Dinis y Reis, 1995). El desove se realiza en primavera y otoño. Los huevos son pelágicos y las larvas, al eclosionar, dependen de sus reservas endógenas durante los dos primeros días, tras los cuales inician la alimentación exógena a base de rotíferos. Las larvas se caracterizan por

mostrar un estómago incipiente y un intestino más desarrollado. Hasta alcanzar el estado juvenil no presentan un digestivo completamente desarrollado (Ribeiro *et al.*, 1999).

Se trata de una especie bentónica que habita en fondos de arena y fango entre los 1 y 100 metros de profundidad. Alcanzan una talla de hasta 60 cm, aunque comúnmente suele oscilar en torno a los 45 cm. Los adultos se alimentan de invertebrados como poliquetos, moluscos bivalvos y pequeños crustáceos.

### **1.3. EL CULTIVO DE *S. senegalensis*.**

El lenguado senegalés no es una especie cuyo estudio se haya iniciado recientemente, ya que desde finales de los años setenta ha sido objeto de interés en la Península Ibérica. Sin embargo, los estudios sobre el cultivo de esta especie han sido escasos durante la mayor parte de este tiempo. Además de esto, el lenguado presenta una mayor complejidad técnica que otras especies ya implantadas, como la dorada o la lubina, por lo que al intentar aplicar las técnicas que han dado buenos resultados en estos cultivos no se han obtenido los resultados esperados. Sólo durante los últimos años se está avanzando en todos los niveles (reproducción, nutrición, patología, etc.) lo suficiente como para solucionar los problemas que existen en el desarrollo de la acuicultura de esta especie.

Los principales problemas para la incorporación de nuevas especies a la acuicultura suelen ser debidos a dificultades tecnológicas, como obstáculos para desarrollar en cautividad alguna de las etapas de su ciclo biológico, o a un escaso valor de mercado. En el lenguado senegalés no existen estos problemas, ya que actualmente se tienen los conocimientos necesarios para completar su ciclo biológico en cautividad y posee un alto valor comercial. Sus problemas están más relacionados con la falta de un manejo de cultivo adecuado, debido al escaso conocimiento de sus necesidades fisiológicas, lo que se traduce en una baja replicabilidad en los resultados de las investigaciones y en brotes de patologías durante el cultivo.

La reciente disponibilidad de alevines en número y calidad suficientes, y la buena expectativa comercial del lenguado ha hecho que un número de empresas cada vez mayor decidan llevar a cabo cultivos de engorde. Los resultados obtenidos son muy diversos, pero se puede afirmar que año tras año hay un incremento en la cantidad de lenguado de piscifactoría presente en el mercado nacional.

### 1.3.1. Evolución del cultivo de *S. senegalensis*.

Durante la década de los 70 el lenguado concentró el interés de muchos investigadores y fue objeto de numerosas experiencias. A finales de los 80 este interés se redujo, abandonándose esta línea de trabajo a favor de otras especies como la lubina. Este abandono se debió a los pobres resultados obtenidos, incapaces de resolver los problemas relacionados con la alimentación y la reproducción. En este momento no existían las técnicas necesarias para que el cultivo del lenguado fuese económicamente rentable, ya que aunque se consiguieron resultados de crecimiento aceptables era necesario emplear ingredientes demasiado caros para su alimentación y la mortalidad y dispersión de tallas eran muy elevadas. En lo referente a la reproducción, se seguía dependiendo de las capturas del medio natural para disponer de un número suficiente de individuos. A estos problemas había que añadir otros, relacionados con las numerosas patologías que afectaban al lenguado.

En los años noventa el mercado de dorada y lubina se encontraba saturado debido al rápido crecimiento en la producción de estas especies. La necesidad de ampliar el mercado desencadenó en la búsqueda de nuevas especies para la acuicultura, entre cuales se encontraba el lenguado senegalés. Inicialmente el cultivo intensivo del lenguado senegalés solamente fue considerado en las zonas en las que tradicionalmente se cultivaba de forma extensiva, principalmente el área Sur-Atlántica peninsular (Drake *et al.*, 1984). Los primeros estudios, realizados por empresas y centros de la zona, tenían como objetivo la reproducción en cautividad de la especie. Gran parte de estos estudios fracasaron y durante años la mayor parte de estos centros fueron incapaces de conseguir puestas en cautividad. A pesar de esto, Dinis *et al* (1999) describen la obtención de un número significativo de puestas, de forma estable durante un periodo de cuatro años consecutivos.

A pesar de los pobres resultados obtenidos por otros centros, en las instalaciones del CIFPA “El Toruño” (IFAPA, Junta de Andalucía), se ha conseguido desde el año 1991 obtener un abundante número de puestas de forma continuada. Esto ha permitido que, gracias a la distribución de huevos fertilizados y larvas, cada vez más empresas desarrollen las técnicas necesarias para la cría larvaria del lenguado.

Hasta la fecha el interés en esta especie se reducía casi exclusivamente a Andalucía, pero en 2002, con la aprobación del Plan Nacional para el cultivo del lenguado, promovido por la

Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), el interés por el cultivo del lenguado se trasladó a otras regiones de españolas. Este plan también ha servido para financiar un número importante de investigaciones y proyectos desarrollados por empresas privadas y por distintos Centros de Investigación (CICEM El Toruño, Cádiz; CIFA Agua del Pino, Huelva; Instituto Español de Oceanografía-IEO, Murcia, Santander y Vigo; Instituto Galego de Formación en Acuicultura-IGAFSA, Pontevedra, entre otros). Este esfuerzo investigador ha permitido controlar la reproducción en cautividad, cría larvaria y engorde, aunque con eficiencias muy diferentes (Dinis *et al.*, 1999; Flos *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1995; Imsland *et al.*, 2003; Cañavate, 2005).

### **1.3.2. Situación actual del cultivo de *S. senegalensis*.**

A pesar de los importantes avances que se han conseguido y del aumento en la producción anual, siguen existiendo diversos problemas en el cultivo del lenguado senegalés que impiden que sea una especie totalmente consolidada.

Durante años la escasez de huevos fertilizados ha limitado el desarrollo del cultivo de *Solea senegalensis* puesto que la mayoría de los centros, a excepción de CIFPA “El Toruño”, no han sido capaces de conseguir puestas con regularidad a partir de los reproductores mantenidos en cautividad. Esto es debido al escaso conocimiento que existía a cerca de los mecanismos que regulan la maduración y la puesta de esta especie en cautividad y a un manejo inadecuado. A pesar de no disponer de todos los conocimientos necesarios, el número de instalaciones que consiguen de reproducción en cautividad del lenguado senegalés es cada vez mayor. Recientemente, varios centros públicos y privados de España y Portugal obtienen puestas de forma abundante y estable.

El cultivo larvario del lenguado es un proceso sin complicaciones hasta el inicio de la metamorfosis, a los 20-21 días de edad, caracterizado por un rápido crecimiento y bajas mortalidades (Fernández-Díaz *et al.*, 2001). Durante esta etapa, las larvas son alimentadas con rotíferos entre 4 a 6 días y posteriormente son alimentadas a base de *Artemia* hasta el destete, a los 40 o 60 días de edad. Es en esta fase, durante el cambio a una dieta inerte, cuando aparece uno de los principales problemas del cultivo, ya que siempre se ha considerado al destete como el principal cuello de botella en el cultivo del lenguado (Dinis *et al.*, 1999).



Esta situación mejoró con el uso de piensos que incluían hidrolizados de harina de pescado (Day *et al.*, 1999) y la co-alimentación con alimento vivo e inerte (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Ribeiro *et al.*, 2005). Esto último ha hecho descender la mortalidad de las larvas durante el transito del alimento vivo a inerte.

El engorde del lenguado senegalés se caracteriza por una buena tasa de crecimiento tanto en los sistemas extensivos en los que tradicionalmente se ha cultivado (Drake *et al.*, 1984), como en condiciones intensivas (Olmedo *et al.*, 2003; Rodríguez y Souto, 2003). Este crecimiento también se caracteriza por una elevada dispersión de tallas, lo que obliga a realizar constantes labores de clasificación. El engorde bajo condiciones intensivas se realiza con cargas elevadas y utilizando una amplia variedad de piensos. La talla comercial se alcanza en un periodo ligeramente superior al año (Figura 4).



**Figura 4.** Ejemplares de *S. senegalensis* en piscifactoría.

La incidencia de patologías, causadas por patógenos como *Photobacterium damsela* (Zorrilla *et al.*, 2003), es el principal factor que en la actualidad limita el engorde del lenguado senegalés (Padrós *et al.*, 2003; Toranzo *et al.*, 2003; Balcázar *et al.*, 2006). La mayoría de estas enfermedades son oportunistas y afectan igualmente a otras especies cultivadas. Estas patologías se ven acentuadas por un mal manejo, como descuidos en las condiciones higiénicas de los tanques, o altas temperaturas que favorecen el desarrollo de patógenos. El control de estas enfermedades normalmente se ha llevado a cabo mediante tratamientos químicos. Sin embargo, esto ha causado la aparición de resistencias a los fármacos y diversos problemas ambientales derivados de la liberación de estas sustancias en el medio acuático.

Recientemente se han realizado estudios sobre vacunación en el lenguado senegalés (Arijo *et al.*, 2005), sin embargo, la vacunación solo ha sido capaz de proteger a los peces durante un corto periodo de tiempo. Debido a esto, la actividad acuícola demanda otras alternativas que permitan el control de enfermedades y que, a la vez, sean respetuosas con el medio ambiente (García de la Banda *et al.*, 2010). En este contexto, los probióticos resultan una alternativa de gran interés para mejorar el estado de condición de los peces y reducir la incidencia de los patógenos en los cultivos (Balcázar *et al.*, 2006).

#### **1.4. LOS PROBIÓTICOS EN LA ACUÍCULTURA.**

Los probióticos se han definido tradicionalmente como “un suplemento alimenticio con microorganismos vivos que son capaces de mejorar el balance intestinal del huésped”. Sin embargo, en los sistemas acuícolas la interacción entre la microbiota y el huésped no se limita al tracto digestivo, por lo que hoy en día esta definición es más amplia, incluyendo además a cualquier preparado de microorganismos vivo o muertos que ejerzan efectos positivos sobre los animales y/o el medio en el que se cultivan (Kesarodi-Watson *et al.*, 2008). El uso de probióticos en acuicultura se ha incrementado en los últimos años debido a sus efectos beneficiosos, como son el incremento de las tasas de crecimiento y conversión del alimento, la disminución del crecimiento de patógenos, la mejora del sistema inmune o el aumento de la tolerancia al estrés (Díaz-Rosales *et al.*, 2009).

Los probióticos han sido usados en las prácticas acuícolas desde hace mucho tiempo, pero en los últimos años se han convertido en una parte integral de las prácticas culturales para la mejora del crecimiento y la resistencia a enfermedades. El rango de probióticos estudiados para el uso acuícola es más amplio que en el ámbito terrestre. Numerosos suplementos de probióticos, tanto mono-específicos como multi-específicos, están disponibles comercialmente para su uso acuícola. Además de beneficios nutricionales y sanitarios, ciertos probióticos, al añadirse al agua, pueden desempeñar un papel importante en la descomposición de la materia orgánica, reducción de niveles de nitrógeno y fosfatos, así como el control de los niveles de amonio, nitritos y sulfuro de hidrógeno (Nayak, 2010).

Numerosos microorganismos han sido identificados como probióticos para las prácticas acuícolas, muchos de ellos, con diferentes modos de actuación. Hay, sin embargo, algunos mecanismos de acción comunes en la mayoría de las cepas probióticas. Los probióticos

ayudan a la conversión del alimento, promoviendo el aumento de peso, y confieren protección frente a patógenos al competir por los lugares de adhesión, producir ácidos orgánicos y otros compuestos como antibióticos o lisozima, además de modular la respuesta inmune innata del pez (Nayak, 2010).

#### **1.4.1. Probióticos en lenguado senegalés.**

En el cultivo del lenguado senegalés, el uso de probióticos se remonta a los primeros ensayos realizados en Japón con el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) a comienzos de la década anterior. Sugita *et al.* (2002) aislaron cepas bacterianas procedentes del intestino de larvas y alevines de esta especie que inhibían el crecimiento de *P. damsela subsp. piscicida*. Estudios posteriores demostraron que la administración del preparado comercial Alchen Poseidon (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Clostridium butyricum* y *Sacharomyces cerevisiae*) incrementaba la resistencia frente al estrés en los ejemplares de lenguado japonés cultivados en circuito cerrado (Taoka *et al.*, 2006).

En España, recientes estudios han demostrado que diferentes especies del género *Shewanella* muestran actividad ante diferentes patógenos. En concreto, la cepa denominada pdp 11, identificada como *Shewanella putrefaciens*, ha demostrado poseer todas las características anteriormente mencionadas *in vitro*, promoviendo un mayor crecimiento y una mejor utilización de nutrientes en *S. senegalensis* (Sáenz de Rodríguez *et al.*, 2009).

Esta bacteria, aislada del mucus de la piel de dorada (*Sparus aurata*, L.), ha sido estudiada por sus aplicaciones como probiótico en el cultivo de lenguado senegalés y dorada. *Shewanella putrefaciens* ha sido descrita como un microorganismo importante en el deterioro del marisco almacenado a bajas temperaturas (Vogel *et al.*, 2005). Sin embargo, las especies del género *Shewanella* también han sido aisladas de otros peces marinos como el bacalao y la platija (Satomi *et al.*, 2006) y de la microfauna intestinal del lenguado senegalés cultivado, especialmente cuando han sido alimentados con presas vivas (Martín-Antonio *et al.*, 2007).

## 1.4.2. Mecanismos de acción de *Shewanella putrefaciens*.

### 1.4.2.1. Respuesta inmune

Numerosos estudios han demostrado que la incorporación de probióticos en la dieta estimulan la respuesta inmune innata y adaptativa de los peces (Panigrahi *et al.*, 2007; Brunt *et al.*, 2008; Merrifield *et al.*, 2010). La incorporación en la dieta de células vivas del probiótico pdp 11 incrementó significativamente estallido respiratorio en los leucocitos de *S. senegalensis* después de 60 días de alimentación, sin embargo este efecto no ha sido observado en peces alimentados con dietas suplementadas con otras especies del género *Shewanella*, como *S. baltica* pdp13 (Díaz-Rosales *et al.*, 2009). Por otro lado, las células inactivadas del probiótico pdp 11 no mostraron *in vitro* una influencia significativa en los parámetros estudiados de la respuesta inmune inespecífica en dorada, como el contenido en peroxidasa de los leucocitos y el estallido respiratorio en los leucocitos del riñón cefálico (Salinas *et al.*, 2006). A pesar de esto, la administración de células inactivadas del probiótico pdp11 incrementaron la actividad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico (Díaz-Rosales *et al.*, 2006).

En lo referente a los efectos del probiótico en el sistema inmune adaptativo, el probiótico pdp11 mostró reacción cruzada frente a anticuerpos específicos sintetizados por especímenes de lenguado senegalés contra *P. damsela subsp. piscicida*. (García-Millán *et al.*, 2009). Un efecto similar ha sido observado por Arijo *et al.* (2008), quién demostró que la administración de células vivas de probióticos resultaban en la expresión de anticuerpos de acción cruzada contra productos extracelulares de *Vibrio harveyi*.

### 1.4.2.2. Efectos gastrointestinales

Se ha demostrado que la inclusión en la dieta del probiótico pdp11 reduce el número de inclusiones de lípidos dentro de los enterocitos, frecuentemente observadas en individuos de lenguado senegalés que son alimentados con una dieta control (Saénz de Rodrigáñez *et al.*, 2009; García de la Banda *et al.*, 2010). La presencia de estas inclusiones en estas células es normal durante el proceso digestivo, pero una excesiva acumulación de lípidos, puede resultar en alteraciones funcionales de los enterocitos (Olsen *et al.*, 2000). Además, la microvilli de los individuos alimentados con la dieta suplementada con pdp11 era más larga y más numerosa (Saénz de Rodrigáñez *et al.*, 2009; García de la Banda *et al.*, 2010). Estos

resultados concuerdan con los registrados por Merrifield *et al.* (2010), quienes observaron microvilli más larga en el intestino proximal de truchas arcoiris alimentadas con dietas suplementadas con probióticos, en comparación con los peces pertenecientes al grupo control. Estos resultados obtenidos en lenguado senegalés sugieren una mayor funcionalidad de los enterocitos debida a la administración de pdp11.

Diferentes autores han comprobado que la ingesta de probióticos modifica la composición de la microbiota intestinal de los peces (Gómez y Balcázar, 2008; Merrifield *et al.*, 2010). Esta composición ha sido evaluada en mayor profundidad mediante diferentes métodos, dependiendo del cultivo, dando como resultado una visión global de la comunidad de bacterias que habitan en el intestino del pez (Wu *et al.*, 2010). La administración de pdp11 a especímenes de lenguado senegalés resultó en una mayor similitud en la microbiota intestinal entre individuos alimentados con la dieta suplementada con probiótico que aquellos recibiendo la dieta control (Tapia-Paniagua *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que la adición de probióticos puede ejercer una rápida estabilización de la comunidad bacteriana intestinal, incrementando el número de bacterias de los género *Shewanella* y *Vibrio* (Tapia-Paniagua *et al.*, 2010). Anteriormente se ha demostrado que el género *Vibrio* es el grupo de bacterias predominante en el intestino de los peces planos (Martín-Antonio *et al.*, 2007). Se ha sugerido que la estabilización de la microbiota intestinal por cepas seleccionadas de probióticos podría ser beneficiosa para la homeostasis de la microfauna intestinal (Kubota *et al.*, 2009). En este sentido la administración del probiótico pdp11 podría favorecer esta homeostasis intestinal en el lenguado senegalés.

#### 1.4.2.3. Efectos en la nutrición

Diferentes estudios han demostrado que el uso de probióticos incrementa la conversión de alimento, los índices de crecimiento y la ganancia de peso en los peces (Taoka *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). La incorporación a la dieta de pdp11 promueve un mayor crecimiento en larvas y juveniles de lenguado senegalés en comparación con las dietas no suplementadas, e incrementa el contenido de proteína en músculo, sugiriendo que la adición del probiótico promueve una mejora en el crecimiento (García de la Banda *et al.*, 2009; Saénz de Rodrigáñez *et al.*, 2009). Además, en los grupos alimentados con pdp11 disminuía la dispersión de tallas respecto al grupo control (García de la Banda *et al.*, 2010). Resultados similares se han obtenido en dorada, indicando que la administración de este probiótico también promueve el

crecimiento en otras especies (Varela *et al.*, 2010). Los individuos de lenguado senegalés alimentados con piensos suplementados con pdp11 incrementaron la actividad leucina aminopeptidasa en el intestino distal respecto a los peces alimentados con la dieta control (Saénz de Rodrigáñez *et al.*, 2009). Todos estos resultados sugieren una mejora en la funcionalidad del intestino en aquellos individuos alimentados con pdp11, lo que conlleva un mejor aprovechamiento del alimento.

Durante las últimas décadas hay un interés en incrementar los niveles de lípidos insaturados en los peces cultivados. Se ha demostrado que la incorporación a la dieta de células vivas del probiótico pdp11 incrementa los niveles de ácido linoleico en el hígado respecto a aquellos individuos que reciben una dieta control o son alimentados con dietas suplementadas con células del probiótico liofilizadas (García de la Banda *et al.*, 2010). Estos ácidos grasos son fundamentales para la regulación del sistema inmune así como para un correcto desarrollo. Estos resultados subrayan la necesidad de la utilización de células frescas del probiótico pdp11 en lugar de células liofilizadas para conseguir un mejor efecto (García de la Banda *et al.*, 2010b).

#### 1.4.2.4. Resistencia a enfermedades

Diferentes virus y bacterias han demostrado afectar al lenguado senegalés. En lo referente a enfermedades víricas, los efectos de los probióticos en la mejora de la resistencia contra virus no son conocidos aún. En los últimos años se ha demostrado que el uso de probióticos confiere protección contra virus, como el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) (Sealey *et al.*, 2007). Si el probiótico pdp11 es capaz de mejorar el estado inmune del pez, podría reducir la susceptibilidad a infecciones virales, sin embargo, es necesario un mayor estudio para corroborar esta hipótesis.

Diversos estudios han demostrado la habilidad de distintas cepas de bacterias de mostrar *in vitro* actividad frente a diversos patógenos, y esto es comúnmente usado en la búsqueda de nuevos candidatos a probióticos. Las bacterias patógenas pueden entrar en el pez por diferentes rutas (piel, agallas y tracto gastrointestinal), siendo la adhesión a las mucosas un paso clave en las infecciones por bacterias patógenas. Por esta razón, la habilidad de adherirse a las mucosas es considerada como un criterio importante para la selección de probióticos,

debido a la competencia entre la bacteria y el probiótico por la adhesión a la mucosa (Vine *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que el probiótico pdp11 es capaz de inhibir *in vitro* el crecimiento de *P. damsela* subsp. *piscicida* y algunas cepas virulentas de *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. anguillarum* (Chabrillón *et al.*, 2005). La adhesión *in vitro* al mucus de la piel y del intestino del lenguado senegalés de *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi* también se ve reducida (Chabrillón *et al.*, 2005), y la administración en la dieta del probiótico pdp11 es capaz de reducir la mortalidad de individuos de lenguado senegalés infectados con *P. damsela* subsp. *piscicida* (Díaz-Rosales *et al.*, 2009; García de la Banda *et al.*, 2010).

### **1.4.3. Administración del probiótico pdp11.**

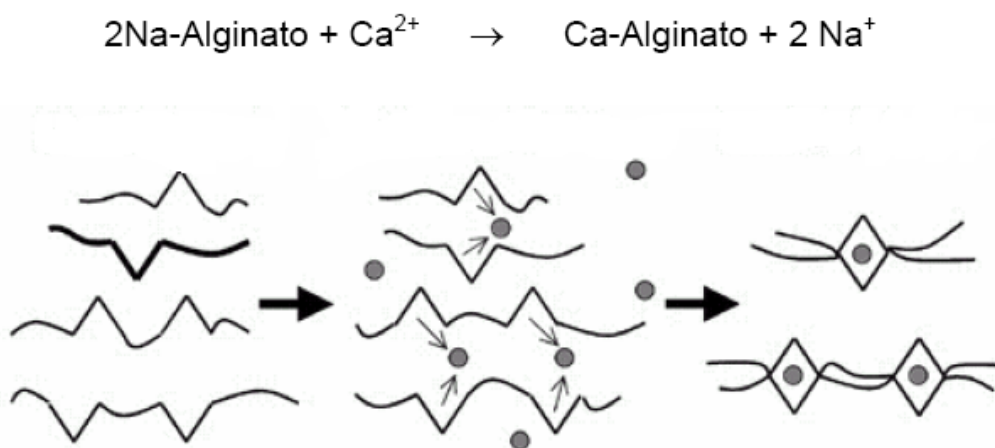
La mayoría de los estudios sobre probióticos tratan sobre los efectos de la incorporación de células vivas en la dieta (Vendrell *et al.*, 2008; Merrifield *et al.*, 2010). Sin embargo, también hay estudios sobre la utilización de células muertas o inactivadas (Taoka *et al.*, 2006) y liofilizadas (Panigrahi *et al.*, 2007; Merrifield *et al.*, 2010). La administración de células inactivadas o liofilizadas es más viable que el uso de células vivas en la industria de la acuicultura. No obstante, Panigrahi *et al.* (2005) observaron que el uso de células vivas como probiótico producía mejores resultados que las células inactivas. Además, las dietas suplementadas con células vivas de pdp11, confieren protección contra *P. damsela* subsp. *piscicida*, pero no así las liofilizadas (García de la Banda *et al.*, 2010).

#### *1.4.3.1. Microencapsulación*

Debido a la naturaleza de los probióticos, y para poder colonizar el intestino y conferir algún beneficio al pez, es necesario que la bacteria sea capaz de llegar a la pared del intestino en cantidad suficiente y que esta pueda resistir el entorno ácido y alcalino que se va a encontrar a lo largo del tracto digestivo del animal (Annan *et al.*, 2007). Además, los procesos como la incorporación del probiótico al pienso y las condiciones de almacenamiento van en detrimento de la viabilidad del probiótico (Rosas-Ledesma *et al.*, 2009). Por esta razón, La encapsulación es un método que se ha demostrado efectivo a la hora de incrementar la viabilidad de diversos probióticos durante su almacenamiento y de protegerlos frente a

condiciones adversas. Se han desarrollado diferentes métodos para la microencapsulación de bacterias. Entre las distintas técnicas, la inmovilización de células vivas en cápsulas de alginato cálcico es una opción frecuentemente utilizada. El alginato presenta la ventaja de no ser tóxico para las bacterias inmovilizadas y está aceptado como aditivo alimenticio.

El alginato es un polímero aniónico formado por dos tipos de monosacáridos, los dos con un grupo ácido, el ácido gulurónico y el ácido manurónico (Silva *et al.* 2006). En presencia de calcio, el alginato forma una estructura conocida como "caja de huevos" (Figura 5). En esta estructura, los iones de calcio actúan como puentes entre los grupos con carga negativa del ácido gulurónico. Las cadenas de alginato pueden asociarse en forma múltiple, dependiendo de la cantidad de calcio presente, dando más rigidez al gel.



**Figura 5.** Reacción química entre el alginato y el calcio, y formación de la estructura de "caja de huevos".

Se ha demostrado que el probiótico *pdp11* puede ser encapsulado en macrocápsulas de alginato cálcico con porcentajes de encapsulación por encima del 80% (Rosas-Ledesma *et al.*, 2009). Este probiótico es inactivado para valores de pH muy ácidos, pero su encapsulación en microcápsulas de alginato cálcico protege a la bacteria de las condiciones ácidas del tracto digestivo de *Solea senegalensis*. Por lo tanto, la encapsulación en alginato cálcico confiere protección a la bacteria frente a valores de pH ácidos; y posteriormente permite la liberación de las bacterias en el intestino del pez sin ningún daño (Moriñigo *et al.*, 2008). Además, las macrocápsulas de alginato cálcico conteniendo células vivas de *pdp11* pueden ser almacenadas a 4 °C durante un mes, con una supervivencia superior al 90 % (Rosas-Ledesma *et al.*, 2011). Esto permite una mayor supervivencia del probiótico en condiciones de almacenamiento y facilita su administración directa a los animales.



## **1.5. INDICADORES DE CONDICIÓN EN PECES.**

### **1.5.1. El sistema inmune en los peces.**

El tracto digestivo, las branquias y el cuerpo de los peces están cubiertos de mucus, convirtiendo estas superficies mucosas en la vía de entrada de patógenos y relacionándolas con la respuesta inmune. Los peces que carecen de escamas, a menudo producen una cantidad mayor de mucus. Este mucus está compuesto por multitud de sustancias, como proteasas, lisozima, citoquininas, etc, encargadas de proteger al individuo frente a la acción de agentes extraños. Debido a esto, el intestino resulta un lugar clave para la inmunoprotección de los peces y está afectado por todos los microorganismos que allí se encuentran, sean patógenos o no.

Los peces tienen la capacidad de responder a ciertos microorganismos ó sustancias que les son extrañas (antígenos) de forma inmediata con respuestas no específicas (innatas), así como con respuestas adaptativas ó específicas, que requieren un proceso de reconocimiento y memoria. Ambos tipos de respuesta inmune implican componentes celulares y humorales que trabajan de forma conjunta, marcando y eliminando dichos microorganismos y sustancias extrañas. En el caso de los peces se ha observado una mayor intensidad en la respuesta inmune innata en comparación con la respuesta inmune adaptativa (Magnadottir, 2006).

Las células encargadas de la inmunidad innata a menudo reconocen estructuras moleculares comunes en patógenos o ciertos productos que éstos liberan mediante receptores en la superficie de las células (Magnadottir, 2006), actuando de inmediato o tras un corto periodo de tiempo al encontrarse con el antígeno (Watts *et al.*, 2001). Estas células incluyen macrófagos, neutrófilos y otros granulocitos. Las bacterias encontradas son fagocitadas y destruidas en el interior de las células a través del estallido respiratorio ó por medio de proteasas, lipasas, fosfatasas u otras sustancias con propiedades antimicrobianas (Neumann *et al.*, 2001). Además, los macrófagos producen lisozimas, que pueden ser estimuladas por productos de ciertos microorganismos.

Numerosos factores humorales han sido asociados a la respuesta inmune innata en peces, como el complemento y las lisozimas (Secombes, 1996). Las interacciones en cascada de proteínas asociadas al complemento son importantes, tanto en la respuesta inmune innata

como en la adaptativa. La lisozima, es una enzima encargada de destruir las células bacterianas al hidrolizar las uniones de los polímeros que forman parte de la pared celular de las bacterias.

Por otro lado, la respuesta inmune adaptativa es llevada a cabo por componentes celulares y humorales y se dirige a antígenos específicos, conservando una memoria. A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, donde esta reacción es más rápida al contar con la ayuda de la respuesta innata, en los peces la respuesta adaptativa puede llevar más de 15 días en manifestarse. Las células y componentes que intervienen son diversos, como los linfocitos B, neutrófilos y macrófagos, proteínas de membrana receptoras de linfocitos T, inmunoglobulinas y sistema del complemento. Sin embargo, el factor humoral más importante en la respuesta adaptativa son las inmunoglobulinas (Ig) producidas por los linfocitos B. En teleosteos el principal anticuerpo es la IgM, producida en el suero (Bengtén *et al.*, 2000), aunque también aparecen otras inmunoglobulinas, como la IgD.

El estudio y cuantificación de las distintas células encargadas de la inmunidad innata del pez, así como de los niveles actividad de distintas enzimas, como la lisozima, resultan muy útiles a la hora de evaluar el estado inmune del pez. Valores anormales en estos recuentos son indicadores de enfermedad, de algún tipo de deficiencia nutricional o de un alto estrés en el cultivo.

### **1.5.2. Las enzimas digestivas como indicadores del estado de condición.**

El estudio de la evolución de las principales actividades enzimáticas digestivas (proteasas, amilasas, lipasas, etc.) durante el desarrollo del pez puede proporcionar una información muy útil para evaluar el estado general del cultivo, ya que se ha comprobado que el nivel de actividad de algunas enzimas actúa como un buen indicador del estado nutricional (Alarcón y Martínez, 1998). Esta información puede emplearse para mejorar la planificación de las pautas de alimentación.

Otra de las utilidades del conocimiento de la fisiología digestiva de una especie concreta es que la información obtenida permite realizar comparaciones con otras especies de interés potencial acuícola, evaluando de esta forma el grado de desarrollo e incluso la posibilidad de utilización de dietas artificiales para reducir los costos de producción en los criaderos.

Con este propósito se emplean diversas técnicas bioquímicas y electroforéticas que permiten conocer de manera detallada y precisa el tipo y niveles de enzimas digestivas presentes en cada momento del desarrollo de cualquier especie.

#### *1.5.2.1. Proteasas.*

Las proteasas (o peptidasas) son enzimas encargadas de hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas. Al ser hidrolasas necesitan moléculas de agua para poder realizar su función. Se encuentran en los organismos vivos y están implicadas en una multitud de reacciones fisiológicas, desde la simple digestión de las proteínas de los alimentos hasta fenómenos como la coagulación sanguínea.

La forma más común de clasificar las peptidasas es en función del lugar por donde realizan la hidrólisis: el extremo de la cadena polipeptídica siendo su objetivo el enlace peptídico terminal (exopeptidasas) o en una zona intermedia de la cadena (endopeptidasas). Las proteasas también se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción, que depende de los residuos aminoacídicos que constituyen su centro activo.

Dentro de las endoproteasas cabe destacar:

- La pepsina, es una proteasa ácida que degrada las proteínas en el estómago y está presente en el jugo gástrico de mamíferos, aves, anfibios y peces. Su pH óptimo de actividad es 1,0.
- La tripsina es una endoproteasa pancreática que hidroliza los enlaces peptídicos constituidos por lisina y arginina. La tripsina es producida en el páncreas y secretada en el duodeno, donde es esencial para la digestión. Su pH óptimo se sitúa alrededor de 8,0. La tripsina es producida en forma de enzima inactiva (tripsinógeno), y luego es activada en el duodeno por la enteroquinasa intestinal a tripsina.
- La quimotripsina es una serina proteasa cuyo principal sustrato incluye el triptófano, tirosina y fenilalanina. Al igual que muchas proteasas, la quimotripsina también hidroliza enlaces éster.

Dentro de las exoproteasas destacan:

- las aminopeptidasas, las cuales catalizan la hidrólisis de los restos aminoacídicos por el extremo amino de la proteína. Están presentes en numerosos tejidos de plantas y animales y entre sus funciones destacan la maduración de proteínas, la degradación terminal de proteínas, la regulación hormonal y el control del ciclo celular.

#### *1.5.2.2. Fosfatasas ácida y alcalina.*

Las fosfatasas ácida y alcalina catalizan la separación de fósforo inorgánico a partir de fosfato orgánico. Se encuentran en los epitelios intestinales y en diferentes capas tisulares del estómago. Su papel está relacionado con procesos de mineralización de los huesos y de transporte a través de membrana. Se ha demostrado en mamíferos que la disminución de actividad fosfatasa alcalina en las células intestinales puede asociarse a estados de malnutrición y enfermedad (Alarcón, 1997).

## 2. ***INTERÉS Y OBJETIVOS***

El lenguado senegalés, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858), es una especie de enorme interés para diversificar la acuicultura marina debido a la saturación del mercado con las especies clásicas. Uno de los problemas para el desarrollo de su acuicultura industrial es la enorme incidencia de patologías en todas las fases de cultivo, como por ejemplo las causadas por *Photobacterium damsela*. El control y tratamiento de estas enfermedades usualmente se realiza mediante tratamientos químicos, pero este manejo ha ocasionado la aparición de resistencias a los fármacos, así como problemas ambientales derivados de la liberación de estas sustancias en el medio acuático. Es por ello que la actividad acuícola demanda otras alternativas que permitan el control de enfermedades y que, a la vez, sean respetuosas con el medio ambiente. En este contexto, la utilización de probióticos supone una alternativa de gran interés para mejorar el estado de condición de los peces y reducir la incidencia de patologías en los cultivos acuícolas.

En peces marinos se ha comprobado la eficiencia de varias especies del género *Shewanella* como potenciales probióticos para su uso en acuicultura. En concreto, la cepa denominada pdp 11, identificada como *Shewanella putrefaciens*, y aislada de piel de dorada, ha demostrado incrementar la respuesta inmune, la resistencia frente a patógenos, y promover mayores tasas de crecimiento y una mejor utilización del alimento en ejemplares juveniles de *S. senegalensis*. Todos estos efectos beneficiosos se obtienen cuando se administra la bacteria en forma viable, pero esta bacteria ha demostrado ser sumamente sensible a la desecación, por lo que su administración con el alimento implica una pérdida importante de su viabilidad. Así, para obviar este inconveniente se suelen preparar a diario partidas de pienso en las que se incorpora la bacteria. Este procedimiento garantiza la administración de células viables pero supone un gran inconveniente cuando se quiere aplicar a gran escala.

En la última definición de “probiótico” para acuicultura propuesta por Merrifield *et al.* (2010) se define como tal a una “célula microbiana viva, **muerta** ó componente celular que, al ser administrado vía alimentación ó en el agua de cultivo, beneficia al huésped, mejorando bien la resistencia frente a las enfermedades, bien el estado de salud, el crecimiento, la utilización de la dieta alimenticia, la respuesta al estrés ó el vigor en general, obteniéndose al menos en parte, una mejora en el balance microbiano del huésped ó del medio que le rodea”. En este contexto, y dadas las dificultades para mantener viables a las células pdp 11 en el pienso, la utilización de células inactivas podría representar una buena alternativa para obviar este inconveniente cuando se aplica a escala industrial. No obstante, en lenguado senegalés no

existe hasta la fecha ningún estudio en el que se evalúen los efectos que ejerce este probiótico sobre el pez cuando se administra de forma inactiva.

Adicionalmente, la microencapsulación es otra alternativa que ha demostrado ser efectiva para incrementar la viabilidad de diversos probióticos durante su almacenamiento, y para protegerlos frente a las condiciones adversas, como las que se presentan cuando las bacterias son incorporadas a un pienso comercial, o durante su tránsito por el aparato digestivo. Entre las distintas técnicas, la inmovilización de células vivas en microcápsulas de alginato cálcico es una opción bastante prometedora para suministrar el probiótico pdp 11 de forma efectiva en el cultivo del lenguado senegalés. Aunque se ha desarrollado un método para elaborar macrocápsulas de 2-3 mm para administrar directamente el probiótico a los peces de forma independiente del alimento (Rosas-Ledesma *et al.*, 2011), no se ha descrito uno equivalente que posibilite la elaboración de microcápsulas (0,1-0,2 mm) que puedan ser administradas en las fases tempranas del cultivo de esta especie (larvas y postlarvas), o que por su pequeño tamaño, puedan ser incorporadas directamente durante la elaboración del pienso como un ingrediente más.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, en el presente trabajo se han establecido los siguientes objetivos:

- 1- Estudiar los efectos de la administración oral del probiótico pdp 11 inactivo sobre el crecimiento, el estado inmune inespecífico y la fisiología digestiva de juveniles de lenguado senegalés
- 2- Desarrollar un protocolo para elaborar microcápsulas con el probiótico *Shewanella* pdp 11 que lo mantengan viable durante su almacenamiento, y tras la exposición a condiciones gastrointestinales de pez

### ***3. MATERIAL Y MÉTODOS***



### 3.1. EVALUACIÓN *IN VIVO* DEL EFECTO DEL PROBIÓTICO INACTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA FISIOLÓGÍA DE JUVENILES DE LENGUADO SENEGALÉS.

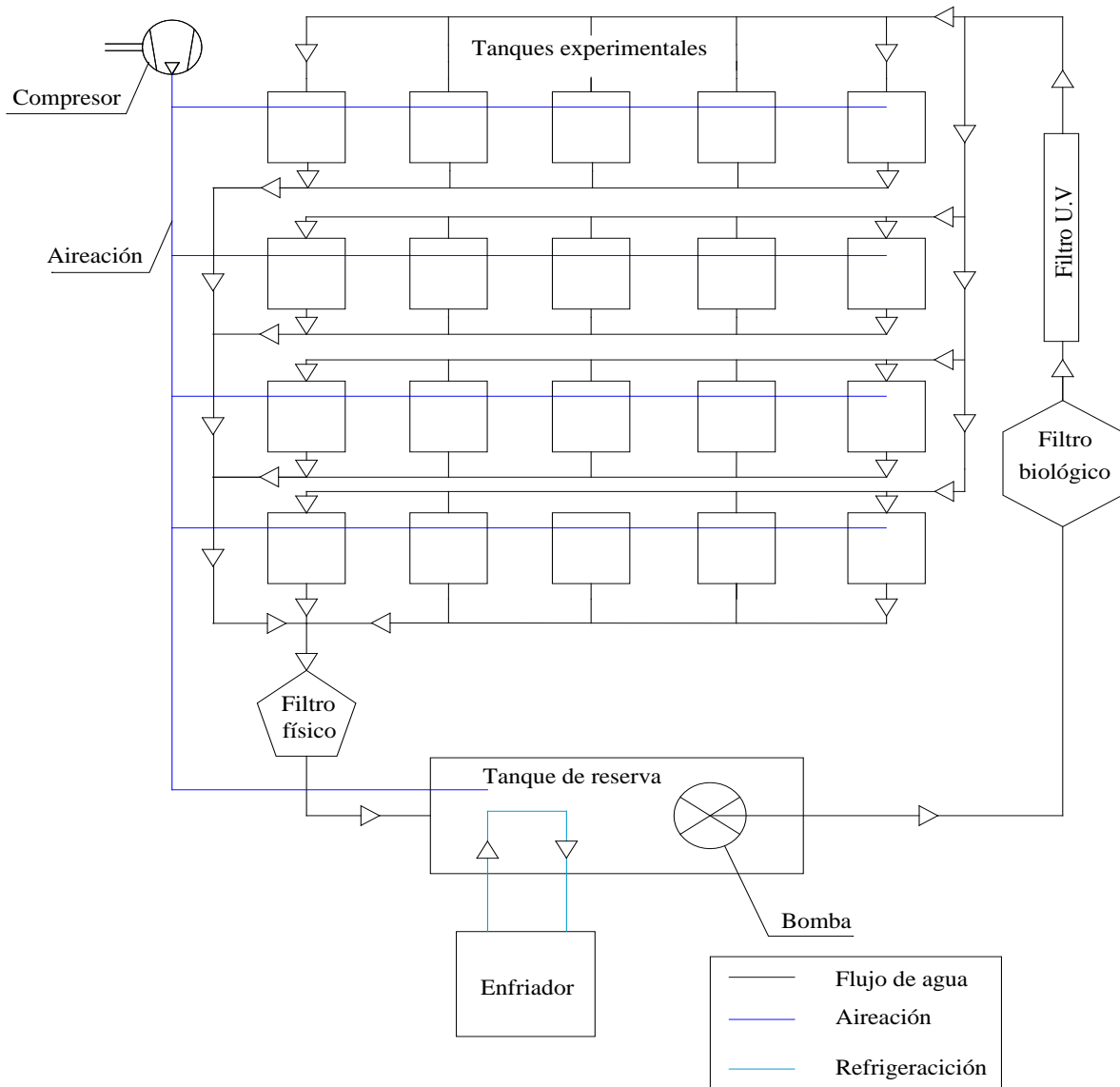
#### 3.1.1. Acondicionamiento del laboratorio húmedo.

Para realizar el bioensayo se instaló, en el laboratorio húmedo de la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Almería, un sistema con 10 tanques experimentales de 0,25 m<sup>2</sup> y 44 L de capacidad, con recirculación de agua y control de temperatura (Figuras 6 y 7). El sistema consta de dos tanques de reserva, uno de 300 L y otro de 400 L. Se incluyeron también lámparas ultravioleta, con el fin de eliminar posibles patógenos, filtros biológicos para el control del amonio y un filtro físico para la retención de residuos sólidos.



**Figura 6.** Detalle del laboratorio húmedo. (A) Tanques experimentales, (B) lámpara de ultravioleta y (C) filtro biológico.

La oxigenación se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento, mediante un soplante y difusores que suministraban el aire a cada uno de los tanques experimentales y a los tanques de reserva. Se estableció un fotoperiodo 12h:12h (luz: oscuridad), con iluminación poco intensa y luz verde.



**Figura 7.** Sistema cerrado utilizado para el ensayo de alimentación con ejemplares juveniles de *S. senegalensis*.

### **3.1.2. Cultivo del probiótico.**

La cepa de bacteria utilizada en el estudio es *Shewanella putrefaciens* (pdp 11) que es un bacilo perteneciente a la familia *Alteromonadaceae* que ha sido utilizada previamente con éxito como probiótico en peces marinos (Díaz-Rosales et al., 2006; García de la Banda, 2011).

El aislado bacteriano se cultivó en tubos de ensayo con 5 mL de caldo de triptona de soja (TSB) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido) con 15 g/L NaCl por un periodo de 18 horas a 22 °C y en agitación continua. Posteriormente, diluciones apropiadas del cultivo líquido se distribuyeron en placas de agar con triptona de soja (TSA) (Oxoid) y 15 g/L NaCl utilizando un hisopo de algodón estéril. Seguidamente las placas fueron incubadas a 22 °C durante 24 h. Las suspensiones bacterianas se prepararon tras raspado de células de las placas con un portaobjetos estéril para obtener la masa bacteriana y, posteriormente, se añadió una solución de cloruro sódico estéril (15 g/L). El número de células bacterianas por mL se cuantificó por recuento en placa tras efectuar las diluciones apropiadas. Seguidamente, la suspensión bacteriana se inactivó por calor a 80°C durante 4 horas, se centrifugó por 15 min a 2000 rpm, y se liofilizó. El preparado de bacterias probióticas así obtenido se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

### **3.1.3. Preparación de los piensos experimentales.**

Con el propósito de evaluar qué efecto ejercen la administración oral del preparado anterior en los juveniles de lenguado senegalés se prepararon cuatro piensos experimentales que incluían concentración crecientes del probiótico de bacterias pdp 11 inactivas.

Las proporciones de probiótico ensayadas fueron 0,5, 1, 2,5 y 5% de inclusión en el pienso (p/p en base seca). La formulación y composición de los piensos experimentales se detallan en las Tablas 1 y 2. Adicionalmente se preparó un pienso control al que no se añadió el liofilizado de bacterias inactivas. Los cinco piensos experimentales elaborados eran isoenergéticos (15-16 mJ/kg pienso), isoproteicos (54-55%) e isolipídicos (11-12%).

**Tabla 1.** Formulación de los piensos experimentales utilizados en el ensayo.

<b>Ingrediente</b>	<b>Control</b>	<b>P-0,5</b>	<b>P-1</b>	<b>P-2,5</b>	<b>P-5</b>
Harina de pescado LT	66,1	65,7	65,2	63,9	61,8
Liofilizado de pdp 11 inactivo	0,0	0,5	1,0	2,5	5,0
Harina de calamar	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hidrolizado de pescado CPSP90	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Concentrado de soja	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Aceite de pescado	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
Enriquecedor de lípidos	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Lecitina de soja	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Maltodextrina	11,3	11,2	11,2	11,0	10,5
Carboximetil celulosa	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Cloruro de colina	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Premezcla de vitaminas y minerales	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Goma guar	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Alginato	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Los resultados se expresan en % peso/peso en base seca. Los ingredientes fueron obtenidos a través de un proveedor local.

**Tabla 2.** Composición química de los piensos experimentales utilizados en el ensayo.

<b>Macronutriente (%)</b>	<b>Control</b>	<b>P-0,5</b>	<b>P-1</b>	<b>P-2,5</b>	<b>P-5</b>
Proteína cruda	51,72	51,83	50,25	52,32	52,72
Extracto estéreo	6,87	6,82	7,12	7,67	7,05
Fibra	0,85	0,52	0,66	1,98	0,72
Cenizas	12,87	12,72	12,33	12,98	12,89
Carbohidratos	27,69	28,11	29,64	25,05	26,62

Los valores se expresan en % peso/peso en base seca.

### **3.1.4. Aclimatación y manejo de los peces.**

Para la evaluación nutritiva se dispusieron 8 lenguados de 40 gramos de peso medio por duplicado para cada tratamiento. Los peces fueron aclimatados durante 1 semana a las nuevas condiciones de temperatura y salinidad del acuario, siendo alimentados 1 vez al día con pienso comercial.

Una vez iniciado el experimento, los peces fueron alimentados tres veces al día, a las 9:00 h, 14:00 h y 17:00 h, con cada pienso experimental. La cantidad de alimento administrado se ajustó a un 2% de la biomasa de cada tanque. Cada 15 días, los peces fueron pesados individualmente (Los ejemplares se identificaron con marcas de tinta en el lado ciego para poder hacer un seguimiento individual de cada individuo durante todo el experimento), previo ayuno de 24 horas, ajustándose el nivel de alimentación a la biomasa existente en cada momento en el tanque.

### **3.1.5. Toma de muestras.**

Al inicio del experimento se procedió a tomar una muestra al azar de 5 peces que fueron medidos y pesados, con una balanza de precisión (0,1 mg), tanto enteros como eviscerados, para la determinación de diversos parámetros zootécnicos. Al final del experimento se sacrificaron todos los individuos supervivientes, a los que se les realizaron las mismas medidas.

Se tomaron muestras de sangre, para determinar el valor de hematocrito, y muestras de plasma sanguíneo para cuantificar los niveles de inmunoglobulina total, las actividades antitripsina en plasma y suero, las actividades fosfatasa alcalina, lisozima y bactericida, así como los niveles de colesterol y triglicéridos.

Para la toma de muestras y medidas, tanto al inicio como al final del experimento, así como para la obtención de las muestras de sangre y plasma, los peces fueron sacrificados cumpliendo la directiva del Consejo 86/609/CEE.

### 3.1.6. Determinación de parámetros zootécnicos.

A partir de todos los pesos y longitudes determinados en el apartado anterior se estimaron los siguientes parámetros zootécnicos:

#### Tasa de crecimiento específico (SGR)

Este parámetro se calculó utilizando la fórmula que se detalla a continuación:

$$\text{SGR (\%)} = (\text{Ln (peso final)} - \text{Ln (peso inicial)} / \text{días}) \times 100$$

Mediante esta expresión se asume que el crecimiento en peso se ajusta a una función exponencial. El valor obtenido expresa el incremento porcentual en peso por día a lo largo de todo el periodo experimental.

Esta tasa resulta útil para comparar crecimientos en periodos de tiempo relativamente cortos (Engrola *et al.*, 2007).

#### Tasa de crecimiento absoluto (AGR)

Esta tasa indica el incremento medio de peso durante un periodo de tiempo, aunque no da información de cómo se producido este incremento. Este parámetro se estimó utilizando la siguiente ecuación matemática:

$$\text{AGR (g/día)} = (\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{días}$$

#### Factor de condición (K)

El factor de condición (K) permite evaluar si los individuos crecen de forma proporcionada, o si por el contrario sólo se está produciendo un aumento de peso sin aumentar la talla del pez. Esto es debido al incremento de tamaño del hígado y algunos tejidos, cuando hay un consumo energético elevado. Por el contrario cuando existe un aporte energético deficiente el factor de condición se reduce. Dicho parámetro se calcula según se detalla a continuación:

$$\text{K (\%)} = (\text{peso final} / \text{longitud final}^3) \times 100$$

### Índice viscerosomático (IV)

Este índice muestra si existe una correcta proporción entre el tamaño del digestivo y el tamaño del pez.

$$IV (\%) = (\text{peso del digestivo} / \text{peso del individuo}) \times 100$$

### Índice hepatosomático (IH)

Indica si existe una correcta proporción entre el tamaño del hígado y el tamaño del pez.

$$IH (\%) = (\text{peso del hígado} / \text{peso del individuo}) \times 100$$

### Índice de conversión de pienso (IC)

$$IC = \text{gramos de pienso suministrados} / \text{incremento de biomasa}$$

Al no poder determinar con exactitud la cantidad de alimento ingerido, se usa la cantidad de alimento suministrada para calcular el índice de conversión. Este índice da una idea del aprovechamiento del alimento, al indicar los gramos de alimento inerte suministrados por cada gramo de biomasa incrementada por el pez.

### Ratio de eficiencia proteica (PER)

Este índice muestra que cantidad de la proteína suministrada es utilizada en incrementar la biomasa del pez.

$$PER = \text{incremento de biomasa} / \text{g de proteína ingerida}$$

### Longitud intestinal relativa (LIR)

Este coeficiente indica la relación entre la longitud del intestino y la longitud del pez. Se determina con la siguiente expresión:

$LIR (\%) = (\text{longitud del intestino} / \text{longitud corporal}) \times 100$

### **3.1.7. Análisis del estado inmune inespecífico de los peces.**

#### ***Inmunoglobulinas totales***

La concentración de inmunoglobulinas totales se cuantificó mediante precipitación con polietilenglicol (PEG). En primer lugar se determinó el contenido de proteína de las muestras de plasma. La proteína total soluble en las muestras se cuantificó con el método de Bradford (1976), utilizando una recta patrón preparada a partir de una solución madre de seroalbúmina bovina (1mg/mL). Para ello se añadieron por triplicado 5  $\mu\text{L}$  de la muestra más 200  $\mu\text{L}$  del reactivo Bradford. Para el blanco, se utilizaron 5  $\mu\text{L}$  de agua destilada en lugar de las muestras de plasma. La absorbancia se registró a 595 nm en un lector de placas de ELISA (Thermo). Seguidamente, se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra de plasma con un volumen igual de una solución al 12 % de PEG (10,000 MW, SIGMA). La mezcla se incubó durante 2 horas, durante las cuales precipitaron las moléculas de inmunoglobulinas, y posteriormente se centrifugó el conjunto a 5000 g y 4° C. El sobrenadante se diluyó 50 veces con NaCl (0,85 %) y se determinó el contenido de proteína. Los niveles de inmunoglobulinas totales se calcularon por diferencia entre la concentración de proteína en las muestras de plasma sin tratar y la concentración en las mismas muestras incubadas con PEG, siendo los resultados expresados en mg/mL.

#### ***Actividad antitripsina***

Para determinar los niveles de actividad antitripsina en suero y plasma, en primer lugar se estandarizó la reacción utilizando un micrométodo con el propósito de establecer la concentración de tripsina porcina necesaria a utilizar durante el ensayo de inhibición (que produjese un incremento lineal de absorbancia de 0,5 en 10 min de ensayo). Para el ensayo de inhibición se añadieron por triplicado 5  $\mu\text{L}$  del suero o plasma sanguíneo (convenientemente diluido a 1/10 ó 1/20, v/v) y 20  $\mu\text{L}$  de la solución de tripsina con la dilución previamente establecida. Se dejó incubar la mezcla a temperatura ambiente 1 hora, transcurrida la cual a los blancos se les añadió 200  $\mu\text{L}$  del tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,1 sin sustrato y al resto de pocillos 200  $\mu\text{L}$  del sustrato tamponado (BAPNA 0,5 mM, Sigma-Aldrich), procediendo a leer la microplaca en continuo a 405 nm en un lector de placas de ELISA (Thermo). La



actividad antitripsina se expresó en porcentaje respecto al valor obtenido en el ensayo control realizado en ausencia de muestra de suero o plasma.

### ***Actividad fosfatasa alcalina***

La actividad fosfatasa alcalina se cuantificó siguiendo la metodología descrita por Bergmeyer (1974). Como sustrato se utilizó una solución al 2% de 4-nitrofenilfosfato (Sigma-Aldrich, Madrid) preparado en tampón dietanolamina 1M con  $MgCl_2$  1mM a pH a 9,8. A 10  $\mu$ L de plasma sanguíneo (diluido 1/3, v/v) se le añadieron  $\mu$ 100de sustrato tamponado por triplicado, y se registró en continuo el incremento de absorbancia a 405 nm. La actividad se expresó en U/mL utilizando para su cálculo como coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol un valor de 16600 M/cm.

### ***Actividad lisozima***

La actividad lisozima en suero se determinó mediante la lisis de un preparado inactivo de la bacteria Gram positiva *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich). Como enzima de referencia se utilizó lisozima de clara de huevo (Sigma, Aldrich, 1 mg/mL). Brevemente, 20  $\mu$ L de la lisozima comercial convenientemente diluida o de la muestra de suero sin diluir se colocaron en una placa de 96 pocillos por triplicado. A continuación se añadieron 175  $\mu$ L de la suspensión de bacterias (0,7 mg/mL en PBS pH 5,8). Las mezclas resultantes se agitaron, y se cuantificó la disminución de la densidad óptica a 540 nm durante 30 min (realizando medidas cada 5 minutos). En todos los ensayo se incluyó un set de 3 pocillos en los que la muestra de suero se sustituyó por PBS y un blanco consiste en 175  $\mu$ L de PBS. Una unidad de actividad lisozima se expresó como la cantidad de enzima que produce una reducción de la absorbancia a 540 nm de 0,001/min.

### ***Actividad antimicrobiana***

Para cuantificar la actividad bactericida, se realizó un cultivo estandarizado de la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila* (CECT 398) en caldo de triptona de soja (TSB), incubándolo durante 24 h a 30 °C. El caldo de cultivo se centrifugó, se lavó con solución salina y se resuspendió en tampón PBS a pH 7. La suspensión bacteriana se diluyó convenientemente con PBS para obtener un total de  $10^7$  células en 5  $\mu$ L. A continuación, 20  $\mu$ L de suero se

incubaron con 5  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana anterior durante 60 min a 25°C. En el ensayo control, el suero se reemplazó por un volumen equivalente de tampón PBS. A continuación se realizó un recuento de células viables en placas con medio agar de triptona de soja (TSA). Brevemente, se agitó vigorosamente la mezcla, tomando posteriormente 10  $\mu\text{L}$  para hacer diluciones seriadas en tubos Eppendorf con 90  $\mu\text{L}$  cada uno de ellos de NaCl 0,85%. Se prepararon diluciones hasta  $10^{-12}$ . Se tomaron triplicados de 10  $\mu\text{L}$  de cada dilución que se llevaron a 2 placas de Petri con medio de cultivo, en las que se habían rotulado 6 cuadrantes por placa correspondientes a las 12 diluciones realizadas. Se incubaron a 22°C durante 24 horas, para observar el crecimiento microbiano en cada dilución. Finalmente, se efectuó el recuento en aquella dilución en que el número de colonias (UFC) estuvo comprendido entre 3 y 30 por cada gota dispensada y dilución. Los resultados se expresaron como  $\log_{10}\text{UFC}$

### **3.1.8. Análisis de otros parámetros sanguíneos.**

#### ***Hematocrito***

Para determinar el hematocrito se colocó sangre heparinizada fresca en un capilar de microhematocrito. El capilar se centrifugó durante 5 minutos a 12 rpm en una centrífuga para micro hematocrito. El valor del hematocrito se calculó con la siguiente expresión:

$$\text{Hematocrito (\%)} = (L_2 / L_1) \times 100$$

Donde L2 es la longitud del capilar ocupada por glóbulos rojos sedimentados y L1 la longitud total que ocupa la sangre en el capilar.

#### **Triglicéridos**

El análisis se llevó a cabo por medio del kit comercial Spinreact, código 1001311, 10x20, adaptado a microplaca de 96 pocillos. Los triglicéridos son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos por medio de la lipasa, el glicerol formado es fosforilado por medio de adenosín trifosfato (ATP) produciendo glicerol-1-fosfato y adenosín difosfato (ADP) en una reacción catalizada por la glicerol kinasa. El ATP se cataliza de nuevo, junto con piruvato, al reaccionar el ADP anterior con fosfoenol piruvato, por medio de la piruvato kinasa. Finalmente el piruvato es reducido a lactato por medio de una oxidación equimolar de NADH en presencia de lactato deshidrogenasa. El NADH presenta un máximo de absorbancia a 340

nm, así la variación en la absorbancia, medida a esta longitud de onda, es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos de la muestra. Para la solución reactiva se reconstituyó respectivamente un vial de reactivo A y otro de reactivo B con 10 y 2 mL de agua destilada. Se mezclaron 10 mL de reactivo A por cada 0,25 mL de reactivo B para obtener el reactivo de trabajo. El kit trae un estándar de 200 mg/dL que, mediante sucesivas diluciones con agua destilada, permite preparar una recta de calibrado en el rango de 0 a 200 mg/dL. En la microplaca se aplicaron 10  $\mu$ L de plasma por duplicado y los estándares (0, 25, 50, 100 y 200 mg/dL) por triplicado. Seguidamente se añadieron 200  $\mu$ L del reactivo de trabajo, y la placa fue sellada con parafilm e incubada a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se midió la absorbancia a 490 nm. El ensayo es lineal en el rango de concentración de 0 a 200 mg/mL.

### **Colesterol.**

El análisis se llevó a cabo por medio del kit comercial Spinreact, código 41021, 2x250, adaptado a microplaca de 96 pocillos. A partir del colesterol presente en la muestra se origina un compuesto coloreado (quinonimina) que absorbe a 505 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada. Los esteroides de colesterol son hidrolizados a colesterol y ácidos grasos por la colesterol esterasa. El colesterol resultante se transforma en colesteno por la enzima colesterol oxidasa, liberándose peróxido de hidrógeno que en una tercera etapa interviene en la formación de quinonimina a partir de 4-aminofenazona con la acción de la peroxidasa. El kit trae un estándar de 200 mg/dL que, mediante sucesivas diluciones con agua destilada, permite preparar una recta de calibrado en el rango de 0 a 200 mg/dL. En la microplaca se aplicaron 10  $\mu$ L de plasma por duplicado y los estándares (0, 25, 50, 100 y 200 mg/dL) por triplicado. Seguidamente se añadieron 200  $\mu$ L del reactivo, y la placa fue sellada con parafilm e incubada a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se midió la absorbancia a 505 nm.

### **3.1.9. Determinación de actividades enzimáticas digestivas.**

En leguado senegalés se han utilizados las enzimas digestivas para evaluar el estado de condición de los peces desde dos perspectivas diferentes (Saénz de Rodrigáñez *et al.*, 2005); i) las actividades proteasa total ácida, proteasa total alcalina y tripsina pueden utilizarse como indicadores de la capacidad digestiva, y ii) las actividades aminopeptidasa y fosfatasa alcalina como indicadores de la funcionalidad del epitelio intestinal

## **Preparación de los extractos enzimáticos**

La preparación de los extractos enzimáticos se realizó en agua mili-Q a 4°C en un homogenizador de vidrio borosilicado de 2 mL utilizando una proporción 1:2 y 1:3 (p/v) para las muestras de estómago e intestino, respectivamente. Seguidamente el homogenado fue vertido en un tubo eppendorf, y sonicado en frío mediante pulsos cortos (Vibra-Cell, Sonics and Materials Inc. Danbury, USA). Posteriormente se centrifugó a 4°C durante 15 min y a 12.500 rpm en una centrífuga Eppendorf 5415R (Eppendorf, San Sebastián de los Reyes. Madrid, España), y el sobrenadante obtenido fue dispensado en alícuotas de 200 µL que se almacenaron a -80°C hasta su uso.

## **Actividades proteasa total ácida y proteasa total alcalina**

La actividad proteasa de los extractos enzimáticos fue cuantificada según el método de Walter (1984), modificado por Alarcón *et al.* (1998). Para la actividad proteasa ácida, 20 µL del extracto estomacal se mezclaron con 1mL de una solución de hemoglobina al 1% en tampón glicina-HCl 0,1M a pH 2. Para la actividad proteasa alcalina, el mismo volumen del extracto intestinal se mezcló con 0,5 mL de tampón Tris-HCl 100 mM a pH 9, y se inició la reacción tras añadir 0,5 mL de azocaseína al 1%. En ambos casos, las mezclas resultantes fueron incubadas a 37°C durante 45 min. A continuación, la reacción enzimática se detuvo con 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, y se enfrió la mezcla a -20°C durante 15 min. Posteriormente, ésta se centrifugó a 4°C durante 10 min a 12 000 rpm, y se determinó la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro (Thermo) a 280 y 366 nm para la actividad proteasa ácida y alcalina, respectivamente. En todos los ensayos se incluyó un ensayo blanco en el que el extracto enzimático se añadió después del TCA. Una unidad de actividad enzimática ácida fue definida como 1 µg de tirosina liberada por min, utilizando como coeficiente de extinción molar de la tirosina 0,008 mL/µg/cm, según la fórmula  $UA/mL = Abs_{280} \times V_f / (0,008 \times t \times V_e)$ , siendo  $V_f$  y  $V_e$  el volumen final de la reacción y del extracto enzimático utilizado en mL, y  $t$  el tiempo de reacción en minutos. La actividad específica de las proteasas alcalinas se cuantificó utilizando la siguiente ecuación:  $UA/mL = Abs_{366} \times V_f / (t \times V_e)$ . La actividad específica de los extractos se expresó como UA/g tejido.

### **Actividad tripsina**

Para cuantificar la actividad tripsina de los extractos intestinales se utilizó una solución de BAPNA (N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilidehydrochloride) al 0,5 mM tamponada con Tris-HCl 50 mM a pH 9. Para el ensayo, 10 a 15  $\mu$ L de extracto enzimático se mezclaron con 200  $\mu$ L del sustrato, y el incremento de absorbancia a 410 nm se cuantificó en continuo en un lector de microplacas, que permite obtener el valor de la pendiente de las cinéticas enzimáticas. En cada ensayo se incluyó un blanco que contenía agua destilada en lugar del extracto enzimático. La actividad se definió como  $UA/mL = Abs_{410}/min \times 10^3 \times V_f / (8800 \times V_e)$ , correspondiendo en valor de 8800 al coeficiente de extinción molar de la p-nitroanilida.

### **Actividades aminopeptidasa y fosfatasa alcalina**

La actividad aminopeptidasa se cuantificó mediante espectrofotometría usando el método modificado de Pfeiderer (1970). Para ello se usó como sustrato una solución 2 mM de L-leucina p-nitroanilida (SIGMA, Madrid) en tampón Tris-HCl 100 mM ajustado pH a 8,8. En cada pocillo se dispensaron 10  $\mu$ L de extracto enzimático y 200  $\mu$ L de solución de sustrato tamponado para iniciar la reacción enzimática. La absorbancia se registró en continuo a 405 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se incluyó un blanco en el que el extracto enzimático se sustituyó por agua destilada.

La actividad fosfatasa alcalina se cuantificó según el protocolo siguiente, en breve, a 10  $\mu$ L de muestra se le añadieron 300  $\mu$ L de sustrato (la solución de trabajo se prepara mezclando una solución de Diethanolamina 1M y cloruro de magnesio 1 mM con otra de p-nitrofenil fosfato 450 mM (97/3, v/v), ajustándose el conjunto a pH 10). Pasados menos de 5 minutos se cuantificó el incremento de absorbancia a 405 nm en continuo en un lector de microplacas. Igualmente se incluyó un blanco que contenía agua destilada en lugar del extracto enzimático. La actividad se expresó en U/mL utilizando para su cálculo como coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol un valor de 16600 M/cm

### **3.2. OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA ELABORAR MICROCÁPSULAS QUE INCLUYAN AL PROBIÓTICO.**

#### **3.2.1. Método de microencapsulación.**

En primer lugar se realizaron cultivos en masa del probiótico pdp 11 en placas de Petri con agar de triptono soja (TSA), suplementadas con 1,5% NaCl. La biomasa celular se recogió y se llevó a un tubo de ensayo estéril con 15 mL de cloruro sódico (0,85 %). A partir de la suspensión se elaboraron dos tipos de microcápsulas.

##### *Microcápsulas de alginato*

Las microcápsulas se elaboraron mediante polimerización externa. Para ello se tomaron 20 mL de una solución de alginato (2%) y se mezclaron con 5 mL de una suspensión celular (preparada con 1,8 mL de suspensión inicial de bacterias y 3,2 mL de NaCl). El conjunto se homogeneizó cuidadosamente. Por otro lado se preparó una segunda solución consistente en 100 mL de aceite de girasol que incluían 0,2 % de Tween 80 (emulsionante). Sobre esta última solución se añadió gota a gota la mezcla de alginato y bacterias mediante una bomba peristáltica, manteniéndose el conjunto en agitación continua (300-350 rpm). Transcurridos 5 minutos se formó una emulsión, y seguidamente sobre la misma se añadieron gota a gota 100 mL de una solución de CaCl<sub>2</sub> al 2% para permitir la formación de las microcápsulas por polimerización externa. Una vez disgregada la emulsión, las microcápsulas se obtuvieron del sedimento tras centrifugación a 350 g durante 10 minutos a 4° C. Finalmente las partículas se tamizaron, lavaron con una solución de cloruro sódico, y se conservaron en frío hasta su análisis. Salvo para los ensayos de conservación, en el resto de análisis, las microcápsulas se prepararon en el mismo día de su utilización.

##### *Microcápsulas de alginato-quitosano*

En este segundo método se llevó a cabo de la misma forma que en procedimiento anterior, pero antes de ser centrifugadas para su recogida, las microcápsulas fueron introducidas en una solución de quitosano (0,1%) durante 30 minutos con agitación suave. Posteriormente las microcápsulas se lavaron con NaCl (0,85%), y se procedió como en se ha indicado en el apartado anterior.

### **3.2.2. Morfología de las cápsulas.**

Para estudiar la morfología y distribución de tamaños de las microcápsulas, se realizaron fotografías a una muestra de éstas al microscopio óptico. Se realizaron varias fotografías a partir de las cuales se determinó el diámetro mayor, el diámetro Feret y la esfericidad de las microcápsulas empleando el programa de software libre UTHSCA ImageTool (Universidad de Texas Health Science Center, San Antonio, TX, disponible en el enlace <http://ddsdx.uthscsa.edu>). El diámetro Feret se definió a partir de la expresión  $\sqrt{(4 \text{ Area} / \pi)}$ , y es el diámetro de un círculo cuya área equivale a la del objeto medido. El grado de esfericidad se determinó a través de los valores de compacidad de las cápsulas, medidos a partir de la expresión  $\sqrt{(4 \text{ Area} / \pi)} / \text{longitud del eje mayor}$ . Los resultados se expresaron como medias y desviación estándar de al menos 100 partículas.

### **3.2.3. Influencia de la concentración de alginato.**

Se prepararon microcápsulas de alginato utilizando distintas concentraciones de alginato: 1%, 2%, 3% y 4%. Para cada concentración de alginato se anotó el peso de las cápsulas y se hizo una microtitulación por triplicado para determinar el número de bacterias encapsuladas.

Para realizar la microtitulación de las cápsulas se tomaron 60 mg de cápsulas y se disolvieron en 600  $\mu\text{l}$  de bicarbonato sódico en un tubo eppendorf, homogeneizando posteriormente la mezcla. A continuación se prepararon diluciones seriadas a partir del contenido del tubo eppendorf anterior. Para ello se tomaron 100  $\mu\text{l}$  del contenido de este y se llevaron a un nuevo tubo con 900  $\mu\text{l}$  de NaCl (0,85 %), tras homogeneizar el contenido se repitió la operación el número de veces necesario (en este caso, 12 diluciones).

Finalmente, se tomaron 10  $\mu\text{l}$  por triplicado de cada una de las diluciones seriadas y se distribuyeron en placas de agar con tripton de soja (TSA) (Oxoid) y 15 g/L NaCl. Las placas fueron incubadas a 22 °C durante 24 h. El número de células bacterianas por mL se cuantificó por recuento en placa en la primera dilución que fuera posible contar entre 3 y 30 unidades formadoras de colonias (UFC).

### **3.2.4. Influencia de la concentración de cloruro cálcico.**

Se prepararon microcápsulas de alginato variando la concentración de  $\text{CaCl}_2$ : 0,5%, 1%, 2% y 3%. Para cada concentración de cloruro cálcico se anotó el peso de las cápsulas y se hizo una microtitulación por triplicado para determinar el número de bacterias encapsuladas.

### **3.2.5. Estabilidad de las cápsulas a temperatura ambiente y a 4 °C.**

La viabilidad de las células probióticas pdp 11 en las microcápsulas almacenadas durante distintos tiempos se analizó en las microcápsulas de alginato y en las microcápsulas de alginato-quitosano. Las microcápsulas se conservaron hidratadas en NaCl (0,85 %). Se estableció un calendario de muestreo a lo largo de los 30 días de almacenamiento de las mismas a temperatura ambiente y a 4°C. En cada día de análisis se tomó una muestra de 60 mg de microcápsulas por triplicado, y se realizó el recuento de células viables en placas TSA como se ha indicado anteriormente.

### **3.2.6. Estabilidad de las cápsulas en una disolución de cloruro sódico.**

Se prepararon los dos tipos de microcápsulas utilizando alginato al 3% y  $\text{CaCl}_2$  al 2%. Posteriormente se tomaron 1,8 g de cápsulas en un vaso de precipitado con 18 mL de NaCl (0,85 %) en agitación suave. A los 0, 30, 60 y 120 minutos se tomaron 600  $\mu\text{L}$  de la solución y se filtraron para eliminar las microcápsulas. De la solución resultante se tomaron 100  $\mu\text{L}$  para realizar el recuento de células viables en placas de TSA y por triplicado. Igualmente se realizó la microtitulación de la solución inicial de bacterias.

### **3.2.7. Capacidad de carga de las cápsulas.**

Se prepararon los dos tipos de microcápsulas incrementando progresivamente el número de bacterias a encapsular desde  $10^6$  a  $10^{12}$  UFC en 5 mL de alginato, y manteniendo el resto de condiciones invariables. A partir de las cápsulas obtenidas se realizaron los correspondientes recuentos de células viables en placas de TSA y por triplicado.

### **3.2.8. Conservación de las cápsulas.**

Se prepararon los dos tipos microcápsulas, y de cada uno de los dos tipos de microcápsulas se dispensaron varias alícuotas de 60 mg en tubos eppendorf para su almacenamiento. Una serie



de alícuotas se almacenó en frío (4 °C) e hidratadas en NaCl (0,85 %), otra serie se congeló a - 20°C, y una tercera se liofilizó. Se tomaron muestras de cada tipo de muestras a tiempo inicial, y a los 7 y 14 días, para efectuar el recuento de células viables en placas de TSA por triplicado, para cada tratamiento y tipo de cápsulas. El primer día también se realizó la microtitulación de la suspensión inicial de bacterias.

### **3.2.9. Ensayo de digestibilidad *in vitro*.**

La capacidad de las microcápsulas para proteger al probiótico ante condiciones gastrointestinales se evaluó mediante simulaciones *in vitro* en medio ácido y alcalino de forma separada, y también de manera secuencial.

Para ello se prepararon microcápsulas de alginato y de alginato-quitosano. Posteriormente se tomaron 1,8 g de microcápsulas que se dispusieron en un vaso de precipitados con 15 mL de tampón universal ajustado a distintos valores de pH. La simulación ácida se realizó en un rango de pH de 2 a 5, mientras que la alcalina de pH 8 a 12. Seguidamente, en la mezcla anterior se añadieron 3 mL de extracto de estómago o intestino de lenguado (100 UA), según el tipo de simulación realizada, manteniéndose la mezcla en agitación suave. A los 0, 30, 60 y 120 minutos se tomaron 60 mg de cápsulas para efectuar el recuento de células viables por triplicado.

La simulación digestiva secuencial se realizó de la misma forma descrita anteriormente, pero el ensayo se inició en un medio con pH ácido (pH 3 y 4) y a los 60 minutos se efectuó un cambio de las microcápsulas a un medio alcalino (pH 9). A los 0 y 30 minutos (de simulación ácida) y a los 60 y 120 minutos (de simulación alcalina), se tomaron 60 mg de cápsulas para efectuar el recuento de viables por triplicado.

### **3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los datos con distribución normal se analizaron estadísticamente con un ANOVA de una vía. Con ellos se procedió a un análisis mediante la prueba de Tukey para identificar diferencias significativas existentes ( $p < 0,05$ ). Los resultados que no poseían distribución normal fueron analizados de forma no paramétrica mediante Kruskal-Wallis. Los datos expresados como porcentaje fueron previamente transformados a su arco seno ( $\sqrt{\text{arco seno } x}$ ). Para el ANOVA se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1.

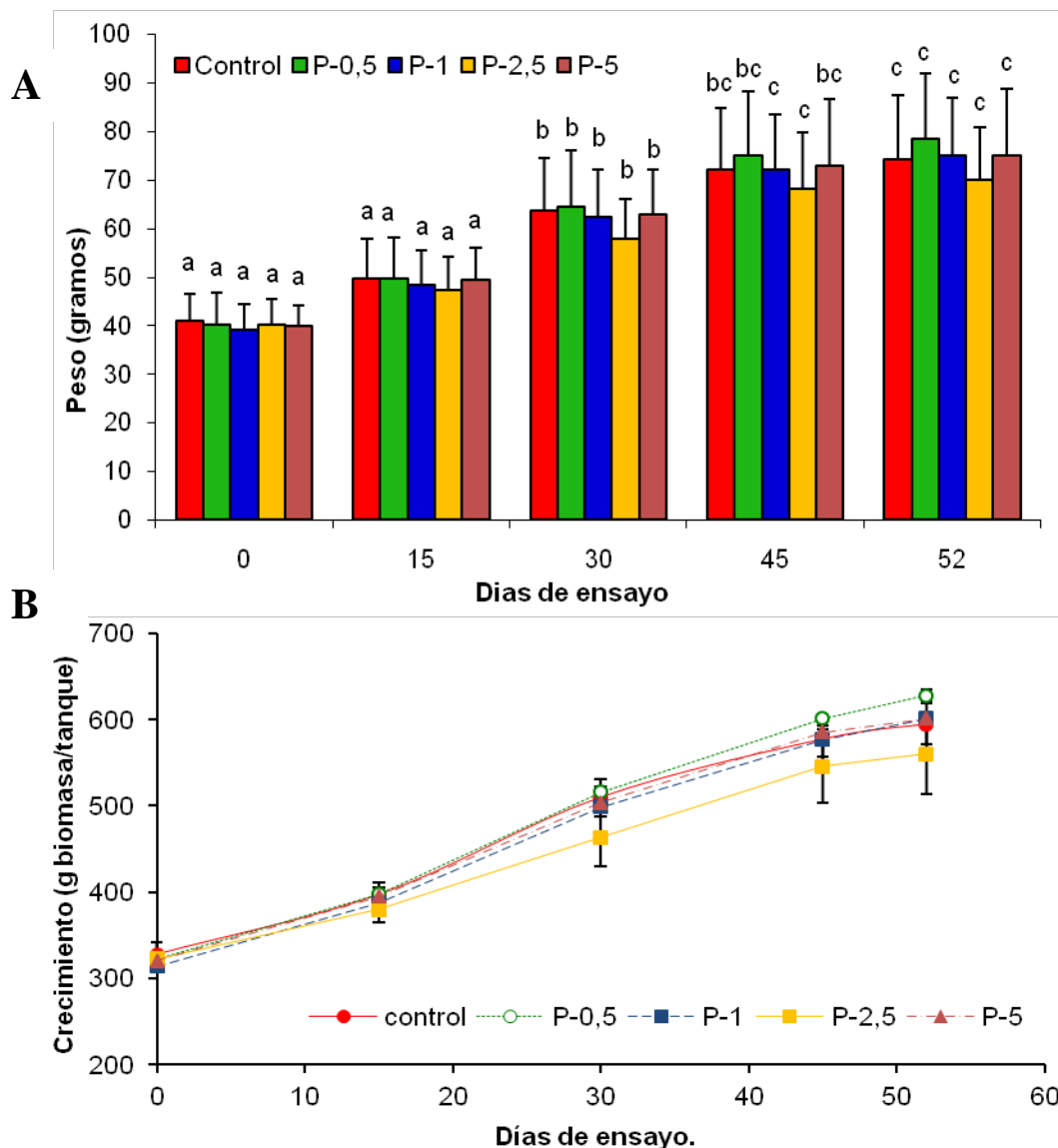
## ***4. RESULTADOS***

---

#### 4.1. EVALUACIÓN *IN VIVO* DEL EFECTO DEL PROBIÓTICO INACTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA FISIOLÓGÍA DE JUVENILES DE LENGUADO SENEGALÉS.

##### 4.1.1. Evolución del crecimiento de los peces.

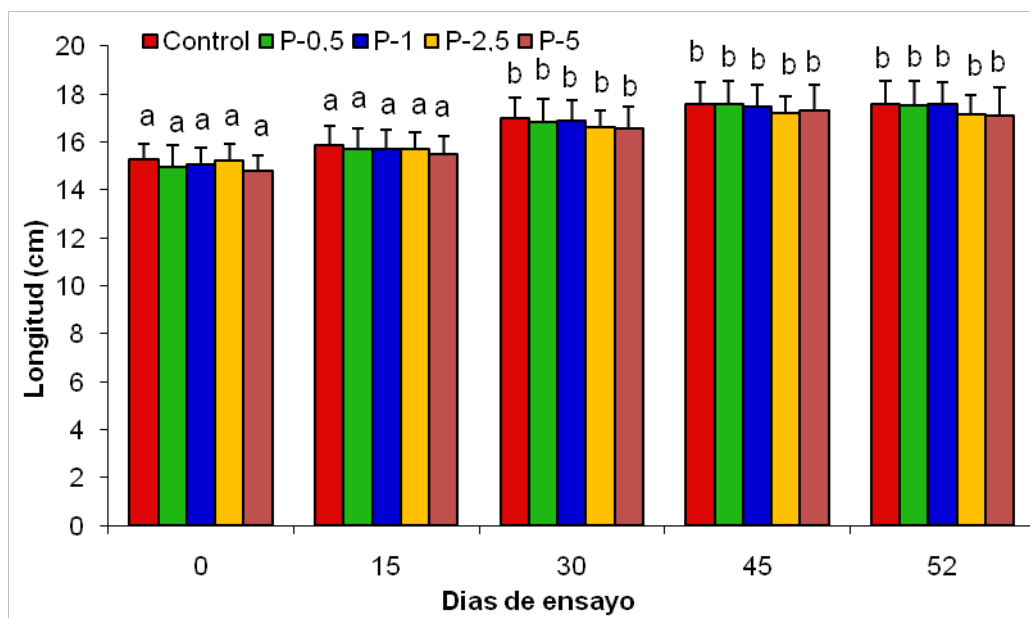
La evolución del peso fresco de los juveniles de lenguado a lo largo del periodo experimental se muestra en la Figura 8 (A).



**Figura 8.** Evolución del peso fresco de los peces (A) e incremento de biomasa en los tanques (B) a lo largo del periodo experimental. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 16$ ). En un mismo día, los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

En general, los individuos del tratamiento P-2,5 presentaron un peso medio inferior al resto a partir de los 30 días de ensayo, tendencia que se mantuvo hasta el final del experimento, aunque sin mostrar diferencias significativas entre tratamientos para un mismo día de muestreo ( $p > 0,05$ ). En la Figura 8 (B) se muestra la evolución del crecimiento del conjunto de los peces, observándose un incremento menor de la biomasa total en los peces de P-2,5 pero sin diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ).

La longitud de los peces no mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) hasta los 30 días de ensayo, momento en el que se produjo un incremento notable de la longitud de los individuos de todos los tratamientos con respecto al punto inicial (Figura 9). En ningún caso se apreciaron diferencias significativas entre tratamientos para el mismo día de muestreo.



**Figura 9.** Evolución de la longitud de los peces a lo largo del periodo experimental. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 16$ ). En un mismo día, los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Las Tablas 3 y 4 recogen los valores medios de los distintos parámetros zootécnicos y morfométricos analizados al final del experimento (52 días). No se apreciaron diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los parámetros estudiados ( $p > 0,05$ ). El peso, longitud y biomasa no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ), sin embargo se observaron valores medios ligeramente más bajos en los peces de P-2,5. El factor K, la tasa de crecimiento específico (SGR) y la tasa de crecimiento absoluto (AGR) también

mostraron el mismo patrón con valores medios más bajos para P-2,5, pero sin diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ).

Los valores del índice de conversión de alimento (IC) y el factor de eficiencia proteica (PER) dan una idea del aprovechamiento del alimento por parte de los peces. En este caso, ambos parámetros tampoco presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ), aunque si tendencias opuestas. El índice de conversión de los tratamientos P-2,5 y P-5 exhibió valores medios superiores al resto y con mayor dispersión. En cuanto al índice PER, los peces alimentados con P-2,5 y P-5 mostraron valores medios inferiores a los de P-0,5 y P-1.

El valor del índice víscero-somático (IV) se incrementó de forma similar respecto al valor que presentaron los peces al inicio del experimento, salvo en los peces de P-5 en los que no se apreció aumento alguno. El índice hepatosomático, aunque sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), fue superior en los animales de P-2,5. Finalmente, la longitud intestinal relativa no presentó diferencias significativas entre tratamientos al final del ensayo de alimentación.

**Tabla 3.** Parámetros zootécnicos y de aprovechamiento nutritivo de los ejemplares juveniles de lenguado senegalés alimentados con los piensos experimentales.

PARÁMETRO	Control	P-0,5	P-1	P-2,5	P-5
Peso inicial (g)	40,97 ± 5,74	40,23 ± 6,61	39,28 ± 5,33	40,33 ± 5,17	40,08 ± 4,18
Peso final (g)	74,36 ± 13,21	78,50 ± 13,58	75,17 ± 11,94	70,06 ± 10,92	75,19 ± 13,68
Incremento peso (g)	33,38 ± 9,06	38,27 ± 8,84	35,89 ± 8,22	29,73 ± 9,63	34,96 ± 12,21
Incremento longitud (cm)	2,31 ± 0,60	2,54 ± 0,62	2,43 ± 0,46	1,99 ± 0,65	2,26 ± 0,90
Incremento biomasa (g)	267,05 ± 9,01	306,17 ± 0,35	287,14 ± 4,01	237,83 ± 46,56	281,14 ± 5,53
Factor K	1,36 ± 0,09	1,45 ± 0,10	1,38 ± 0,14	1,37 ± 0,10	1,49 ± 0,13
SGR	1,13 ± 0,20	1,28 ± 0,19	1,24 ± 0,19	1,06 ± 0,28	1,18 ± 0,34
AGR	0,64 ± 0,17	0,74 ± 0,17	0,69 ± 0,16	0,57 ± 0,19	0,67 ± 0,23
IC	1,57 ± 0,50	1,34 ± 0,33	1,40 ± 0,44	1,72 ± 0,71	1,73 ± 1,08
PER	1,34 ± 0,36	1,52 ± 0,35	1,52 ± 0,35	1,25 ± 0,41	1,35 ± 0,47

Los valores muestran la media ± de. (n = 16). Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) para un mismo parámetro. Las unidades empleadas son: peso (mg), longitud (cm), biomasa (g tanque<sup>-1</sup>), factor K (%), SGR = tasa de crecimiento específico (%), AGR = tasa de crecimiento absoluto (g día<sup>-1</sup>), IC = índice de conversión de alimento (g alimento x g biomasa<sup>-1</sup>), PER = ratio de eficiencia proteica (g x g proteína ingerida<sup>-1</sup>).

**Tabla 4.** Índices morfométricos de los ejemplares juveniles de leguado senegalés alimentados con los piensos experimentales durante 52 días.

	<b>inicial</b>	<b>Control</b>	<b>P-0,5</b>	<b>P-1</b>	<b>P-2,5</b>	<b>P-5</b>
IV final	2,88 ± 0,28	3,30 ± 1,02	3,09 ± 0,76	3,13 ± 0,69	3,20 ± 0,82	2,86 ± 0,30
IH final	0,98 ± 0,45	1,10 ± 0,24	1,24 ± 0,32	1,15 ± 0,22	1,42 ± 0,61	1,11 ± 0,17
LIR final	136,63 ± 47,48	210,90 ± 27,20	201,33 ± 38,92	181,46 ± 31,11	193,38 ± 25,23	203,75 ± 34,67

Los valores muestran la media ± de. (n = 16). Los valores con diferentes superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) para un mismo parámetro. Las unidades empleadas son: IV = índice víscero-somático (%), IH = índice hepatoesomático (%), LIR = longitud intestinal relativa (%).

Finalmente, en la Tabla 5 se muestra la composición química de las carcasas de los peces alimentados con concentraciones crecientes del probiótico pdp-11 inactivo. Los resultados evidencian que no existen diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 5.** Composición proximal (% en base seca) y humedad de los peces al final del experimento.

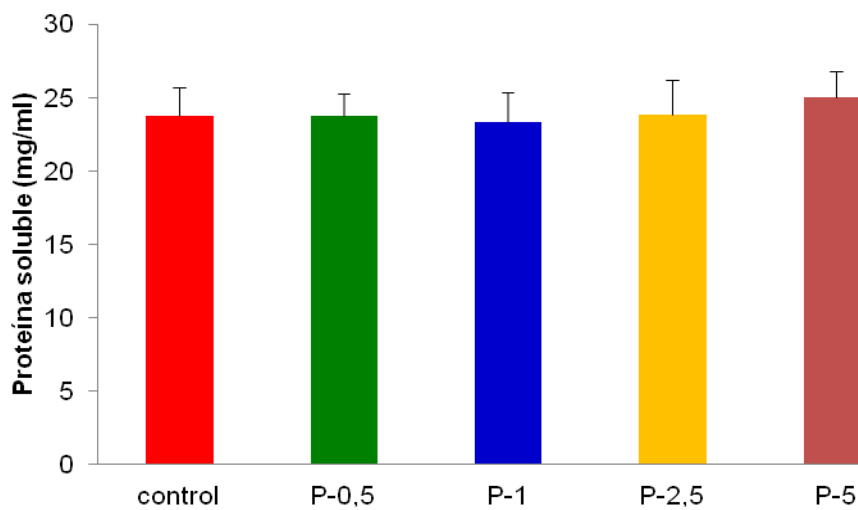
	<b>Control</b>	<b>P-0,5</b>	<b>P-1</b>	<b>P-2,5</b>	<b>P-5</b>
Proteína cruda	68,54 ± 0,40	67,64 ± 0,59	67,37 ± 0,17	67,74 ± 0,92	68,08 ± 0,69
Extracto etéreo	6,96 ± 3,79	9,14 ± 4,77	8,02 ± 7,66	10,16 ± 5,72	8,65 ± 1,42
Fibra	0,27 ± 0,21	0,23 ± 0,16	0,37 ± 0,25	0,26 ± 0,12	0,40 ± 0,30
Cenizas	8,58 ± 0,33	8,37 ± 0,13	8,37 ± 0,33	8,59 ± 0,01	8,73 ± 0,43
Carbohidratos	15,66	14,63	15,88	13,26	14,15
Humedad (%)	74,47 ± 0,96	74,32 ± 0,94	74,16 ± 1,32	73,99 ± 0,90	74,70 ± 1,29

Los valores muestran la media ± de. (n = 2). Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) para un mismo parámetro. Los resultados se expresan en % sobre el peso seco.

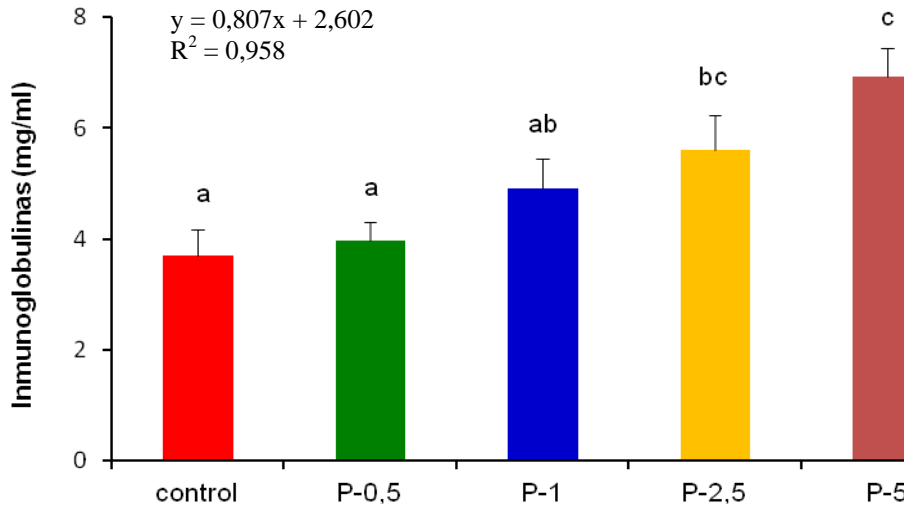
#### 4.1.2. Evaluación del estado inmune de los peces.

Además del estudio de los parámetros zootécnicos, se analizaron en el suero o plasma de los peces otros indicadores relacionados con el estado inmune inespecífico de los peces. En concreto se cuantificó la concentración plasmática de inmunoglobulinas totales, la actividad antitripsina, los niveles de actividad de fosfatasa alcalina y lisozima, y la actividad antimicrobiana del suero.

Como puede verse en la Figura 10, la concentración de proteína en plasma no presentó diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, la concentración de inmunoglobulinas totales (Figura 11) se incremento de forma gradual conforme lo hizo la cantidad de probiótico añadido al pienso experimental ( $y = 0,807x + 2,602$ ;  $R^2 = 0,958$ ). Los peces de P-1, P-2,5 y P-5 presentaron concentraciones superiores al control ( $p < 0,05$ ), llegando en el caso de P-5 a duplicarse los valores con respecto al control.

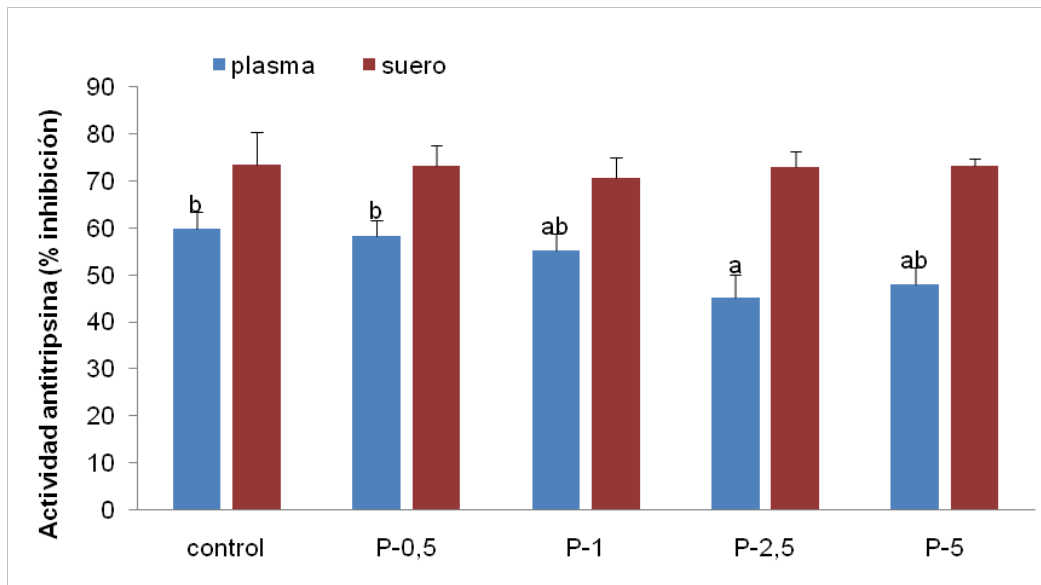


**Figura 10.** Concentración plasmática de proteína soluble de los ejemplares de lenguado senegalés al final del periodo experimental. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 16$ ). Los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo día ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11.** Concentración plasmática de inmunoglobulinas totales de los ejemplares de lenguado senegalés al final del periodo experimental. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 16$ ). Los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo día ( $p < 0,05$ ).

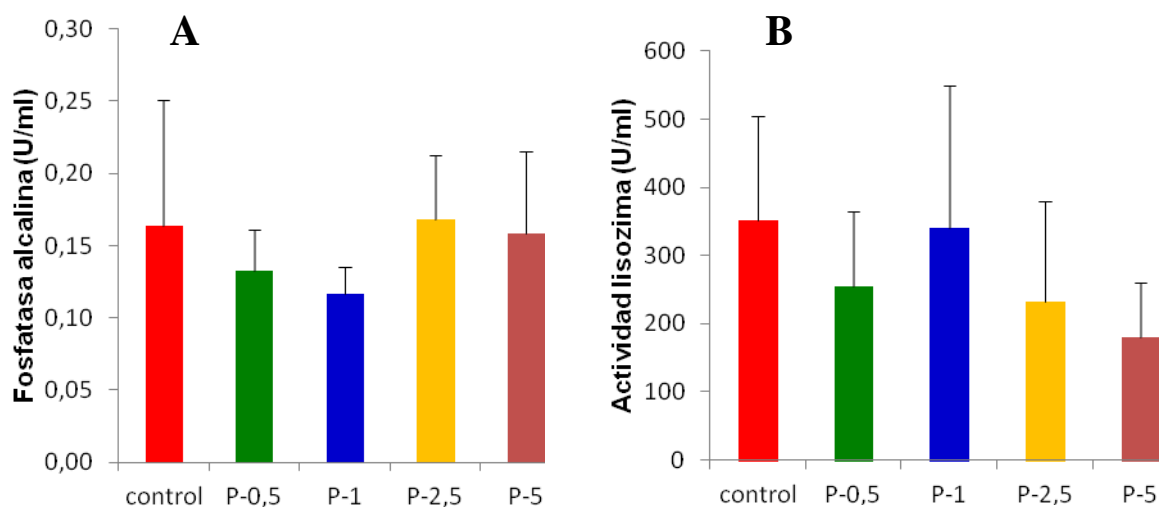
La Figura 12 muestra la actividad antitripsina en el suero y plasma de los lenguados al final del ensayo. El porcentaje de inhibición obtenido con las muestras de plasma fue menor en los tratamientos con mayor concentración de probiótico (P-1, P-2,5, P-5), siendo este significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en el caso de P-2,5. Por otro lado, la inhibición obtenida con las muestras de suero no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), ya que todos los animales mostraron valores similares al control.



**Figura 12.** Actividad antitripsina (expresada en % de inhibición sobre una tripsina comercial de referencia) cuantificada en el plasma (azul) y suero (marrón) de los ejemplares de lenguado senegalés al final del periodo experimental. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 16$ ). Los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo día ( $p < 0,05$ ).

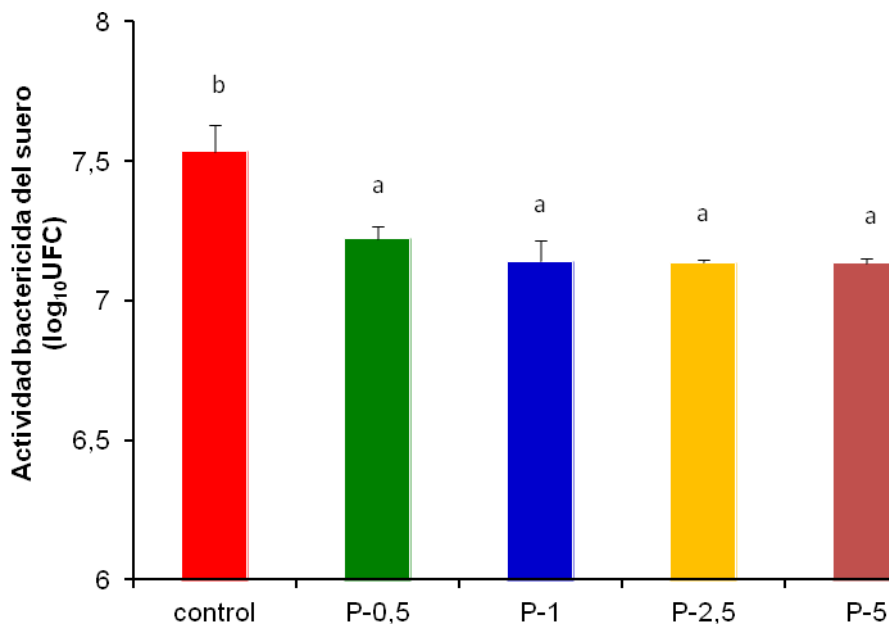


Las actividades fosfatasa alcalina y lisozima (Figura 13) no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ). En el primero de los casos se observó que la actividad fosfatasa alcalina presentaba valores medios superiores en los peces alimentados con una mayor proporción de probiótico (P-2,5 y P-5), pero sin mostrar diferencias significativas respecto al control. En lo que respecta a la actividad lisozima, a pesar de no encontrarse diferencias significativas, los peces de P-2,5 y P-5 mostraron valores medios más bajos que el resto.



**Figura 13.** Actividades fosfatasa alcalina (A) y lisozima (B) en el plasma de los ejemplares de lenguado senegalés al final de experimento. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. (n = 16). Los valores con diferentes índices indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo día ( $p < 0,05$ ).

Los sueros de los peces alimentados con probiótico inactivo mostraron mayor capacidad para inactivar las células de un cultivo estándar de *Aeromonas hydrophila* (Figura 14). Este hecho viene reflejado por un recuento significativamente más bajo de unidades formadoras de colonias (UFC) cuando se incubaron sus sueros con un inóculo estándar de bacterias patógenas en comparación con el recuento obtenido al utilizar el suero de los peces del tratamiento control. Así, la actividad sérica antimicrobiana fue significativamente mayor en todos los tratamientos que incluyen probióticos ( $p < 0,05$ ), aunque no se apreciaron diferencias significativas entre ellos.



**Figura 14.** Actividad bactericida del suero (expresada como recuento de bacterias viables de un inóculo de referencia, expresado en log<sub>10</sub>UFC) de los ejemplares de lenguado senegalés al final del experimento. Los valores muestran la media ± d.e. (n = 16). Los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo día ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.1. Evaluación de los metabolitos plasmáticos y del hematocrito.

Adicionalmente se midieron los niveles de colesterol y triglicéridos en el plasma. Se ha descrito que el nivel de estos metabolitos está relacionado con el estado de salud de los peces, y por lo tanto con su capacidad para tolerar condiciones de estrés o infecciones causadas por agentes patógenos. La Tabla 6 muestra la concentración plasmática de colesterol y triglicéridos en los peces alimentados con los piensos experimentales. Los resultados obtenidos indican que ninguno de los dos parámetros presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ). No obstante, se produjo un incremento en los valores medios de ambos parámetros, en todos los peces alimentados con los piensos que incluyen una mayor proporción del probiótico inactivo.

Los valores del hematocrito tampoco presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ), registrándose valores en torno al 11%.

**Tabla 6.** Concentración de colesterol y triglicéridos en el plasma sanguíneo, y valores del hematocrito de los ejemplares de lenguado senegalés al final del experimento.

PARÁMETRO	Control	P-0,5	P-1	P-2,5	P-5
Colesterol (mg/dL)	201,64 ± 41,94	197,62 ± 89,11	238,69 ± 58,01	270,85 ± 76,34	253,67 ± 89,28
Triglicéridos (mg/dL)	638,98 ± 175,11	866,97 ± 567,00	974,51 ± 493,47	1110,29 ± 246,98	884,12 ± 352,46
Hematocrito (%)	10,59 ± 1,30	11,15 ± 2,16	-	10,57 ± 1,77	11,27 ± 2,49

Los valores muestran la media ± de. (n = 7). Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) para un mismo parámetro. Los resultados se expresan en mg/dL.

#### 4.1.3. Evaluación de las actividades enzimáticas digestivas.

Además del estudio de los parámetros zootécnicos e inmunológicos, se determinaron los niveles de actividad de varias enzimas digestivas con el propósito de analizar qué estado de condición poseían los peces al final del periodo experimental tras la administración del probiótico inactivo. El estudio de las enzimas digestivas se enfocó desde dos perspectivas distintas: 1) las actividades proteasa total ácida, proteasa total alcalina, y tripsina como indicadores de la capacidad digestiva de los peces; y 2) las actividades aminopeptidasa y fosfatasa alcalina como indicadores de la funcionalidad del epitelio intestinal.

En la Tabla 7 se muestran los valores de las actividades enzimáticas digestivas cuantificadas en los extractos estomacales e intestinales de los juveniles de lenguado senegalés. Las actividades correspondientes al intestino, se determinaron por separado en extractos de intestino proximal y de intestino distal.

Los niveles de actividad proteasa ácida no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ). De igual modo, la actividad proteolítica total alcalina en el intestino proximal no mostró diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, en el intestino distal, los peces alimentados con el pienso control presentaron un nivel de actividad proteasa significativamente mayor que en los del resto de tratamientos ( $p < 0,05$ ). Los peces alimentados con piensos suplementados con el probiótico inactivo mostraron valores similares entre ellos. Para la actividad tripsina se observó el mismo patrón descrito anteriormente, no encontrándose diferencias significativas en el intestino proximal, pero los niveles de actividad de los extractos del intestino distal de los animales del control fueron significativamente más

altos que los cuantificados en los animales que ingirieron probióticos inactivos con el alimento ( $p < 0,05$ ).

La actividad aminopeptidasa no presentó diferencias significativas ni en el intestino proximal ni en el distal ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, los valores medios de actividad en los animales alimentados con la mayor proporción de probiótico fueron menores que los del resto de tratamientos en ambos segmentos intestinales, sin mostrar diferencias significativas. Los niveles de actividad fosfatasa alcalina en el intestino proximal fueron significativamente mayores en los animales alimentados con P-5 ( $p < 0,05$ ), llegando a cuadruplicar los valores que presentaban los peces de otros tratamientos. Por el contrario, en el intestino distal, no se encontraron diferencias significativas para esta actividad ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 7.** Actividades enzimáticas digestivas determinadas en los extractos estomacales e intestinales de los ejemplares juveniles de lenguado senegalés al final del experimento.

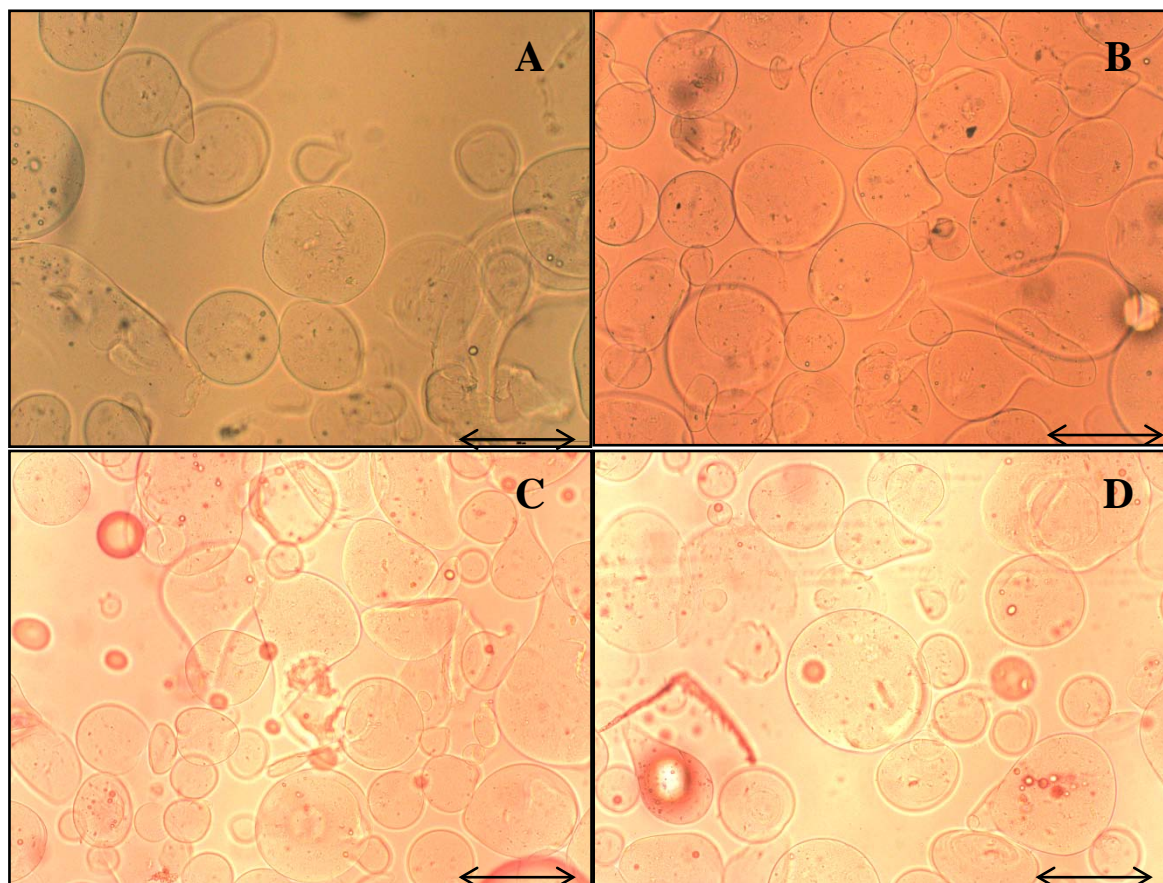
Actividad	Tratamiento				
	CT	P-0,5	P-1	P-2,5	P-5
<b>Proteasa ácida</b>	1008,82 ± 284,23	788,46 ± 278,05	1018,15 ± 317,07	693,75 ± 239,12	767,05 ± 308,37
<b>Proteasa alcalina</b>					
I. proximal	19,26 ± 5,86	23,97 ± 8,51	29,97 ± 6,31	17,84 ± 10,16	17,74 ± 2,46
I. distal	19,96 ± 13,91 <sup>b</sup>	2,15 ± 2,11 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,33 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,53 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,53 <sup>a</sup>
<b>Tripsina</b>					
I. proximal	1,11 ± 0,80	1,35 ± 0,54	0,55 ± 0,18	0,90 ± 0,68	1,43 ± 0,90
I. distal	1,19 ± 0,43 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,02 <sup>a</sup>
<b>Aminopeptidasa</b>					
I. proximal	1,86 ± 0,82	1,99 ± 1,28	1,36 ± 0,77	0,59 ± 0,16	1,25 ± 0,21
I. distal	1,55 ± 0,43	2,00 ± 0,76	1,68 ± 0,82	1,14 ± 0,48	1,04 ± 0,20
<b>Fosfatasa alcalina</b>					
I. proximal	321,96 ± 122,99 <sup>a</sup>	220,62 ± 96,42 <sup>a</sup>	190,42 ± 88,67 <sup>a</sup>	183,39 ± 150,25 <sup>a</sup>	842,69 ± 407,67 <sup>b</sup>
I. distal	245,49 ± 145,69	314,26 ± 255,06	132,21 ± 82,25	101,28 ± 26,84	111,46 ± 35,73

Los valores muestran la media ± d.e. (n = 5). Los valores con diferentes superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos para un mismo parámetro. Los resultados se expresan en U/g tejido.

## 4.2. OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA ELABORAR MICROCÁPSULAS QUE INCLUYAN AL PROBIÓTICO.

### 4.2.1. Caracterización morfológica de las microcápsulas.

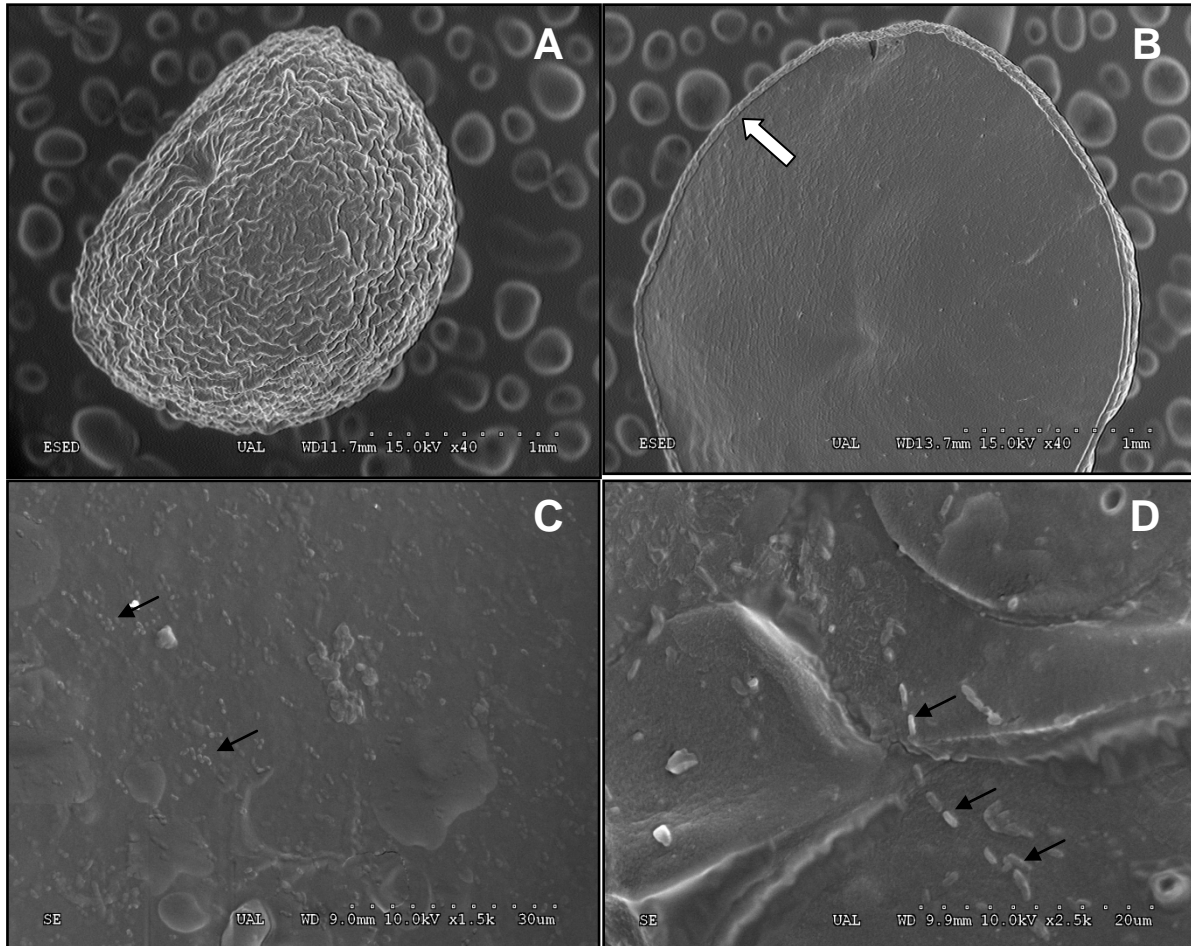
En la Figura 15 se muestra un detalle de las microcápsulas al microscopio óptico. En general, el protocolo utilizado permite la elaboración de microcápsulas con una amplia dispersión de tamaños aunque predominan, como se detallará a continuación, las partículas con un diámetro comprendido entre 100 y 150  $\mu\text{m}$ . En cuanto a su morfología, aunque predominó la forma esférica, también pudieron apreciarse numerosas microcápsulas con forma de lágrima, especialmente más frecuente en las microcápsulas de mayor tamaño.



**Figura 15.** Detalle de microcápsulas de alginato al microscopio óptico.  
(Barra de escala = 200 $\mu\text{m}$ . Aumentos x 200)

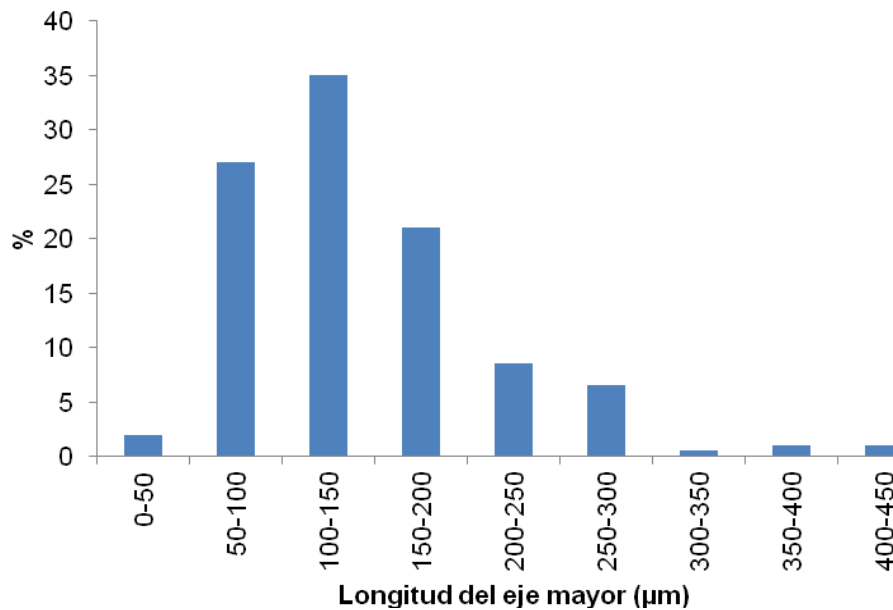
La Figura 16 muestra un detalle de las microcápsulas al microscopio electrónico de barrido. La Figura A muestra una microcápsula de alginato recién preparada e hidratada. En la Figura B se observa un corte transversal de una microcápsula de alginato-quitosano, en la que se

aprecia claramente el engrosamiento de la cubierta debido al recubrimiento con quitosano. En las Figuras C y D se detalla a más aumento el interior de una microcápsula, pudiéndose distinguir las bacterias probióticas como elementos con morfología bacilo atrapados en la matriz de alginato cálcico.



**Figura 16.** Detalle de microcápsulas al microscopio electrónico: microcápsula de alginato hidratada (A), sección transversal de una microcápsula de alginato-quitosano con detalle de la cubierta (B), y detalle de las bacterias en el interior de las cápsulas deshidratadas y metalizadas con oro (C y D). Aumentos: A y B (x 40), C (x 1500) y D (x 2500).

A partir de las mediciones de la longitud del eje mayor en una muestra de 200 microcápsulas y con el propósito de comprobar la dispersión de tamaños, se realizó un histograma de distribución agrupando las microcápsulas en intervalos de tamaño de 50  $\mu\text{m}$  desde 0 hasta 450 (Figura 17). El 85 % de las cápsulas se localizó en los intervalos comprendidos entre 50 y 200  $\mu\text{m}$ , registrándose el mayor número de microcápsulas en el intervalo 100–150 (35%). Las microcápsulas con un tamaño inferior a 50  $\mu\text{m}$  y superior a 250  $\mu\text{m}$  representaron menos del 10 % del total de microcápsulas contenidas en la muestra.



**Figura 17.** Histograma de distribución de tamaños (longitud del eje mayor en  $\mu\text{m}$ ) en una muestra de 200 microcápsulas. Los valores muestran el porcentaje de partículas en cada intervalo de tamaños.

Además de la longitud del eje mayor, se realizaron otras mediciones para evaluar en mayor detalle la dispersión de tamaños y la morfología de las microcápsulas (Tabla 8).

El área de las microcápsulas se incrementó proporcionalmente a la longitud del eje mayor ( $p < 0,05$ ). Cabe destacar una mayor variabilidad conforme se incrementó el diámetro de las microcápsulas. El diámetro de Feret presentó una pauta similar, así como valores próximos a los de la longitud del eje mayor (véase Tabla 8). Al igual que en los demás parámetros analizados, las microcápsulas más grandes mostraron mayor heterogeneidad para este índice, como se evidencia en los valores de desviación estándar.

Las microcápsulas con un tamaño superior a las 250 micras presentaron poca esfericidad ( $p < 0,05$ ). Este parámetro, con valores comprendidos entre 0 y 1, mostró valores significativamente mayores en las microcápsulas de menor tamaño ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 8.** Resultados del estudio del tamaño y morfología de las microcápsulas.

CATEGORÍA	PARÁMETRO			
	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Eje mayor ( $\mu\text{m}$ )	Diámetro Ferret ( $\mu\text{m}$ )	Esfericidad
Longitud eje mayor				
0-50	1344,4 $\pm$ 179,3 <sup>a</sup>	49,03 $\pm$ 1,21 <sup>a</sup>	44,29 $\pm$ 2,55 <sup>a</sup>	0,88 $\pm$ 0,07 <sup>cd</sup>
50-100	3737,9 $\pm$ 1423,4 <sup>a</sup>	76,39 $\pm$ 17,05 <sup>b</sup>	67,29 $\pm$ 15,22 <sup>b</sup>	0,87 $\pm$ 0,12 <sup>d</sup>
100-150	8190,0 $\pm$ 2049,7 <sup>b</sup>	120,38 $\pm$ 12,22 <sup>c</sup>	101,36 $\pm$ 12,52 <sup>c</sup>	0,84 $\pm$ 0,07 <sup>cd</sup>
150-200	16012,9 $\pm$ 4215,1 <sup>c</sup>	171,90 $\pm$ 15,06 <sup>d</sup>	141,65 $\pm$ 18,20 <sup>d</sup>	0,82 $\pm$ 0,08 <sup>bcd</sup>
200-250	26503,58 $\pm$ 5160,33 <sup>d</sup>	220,95 $\pm$ 13,34 <sup>e</sup>	182,94 $\pm$ 17,16 <sup>e</sup>	0,83 $\pm$ 0,10 <sup>bc</sup>
250-300	41290,31 $\pm$ 20746,04 <sup>d</sup>	308,08 $\pm$ 63,89 <sup>f</sup>	223,11 $\pm$ 55,01 <sup>e</sup>	0,72 $\pm$ 0,10 <sup>abcd</sup>
300-350	29612,95 $\pm$ 8597,63 <sup>d</sup>	264,37 $\pm$ 9,39 <sup>f</sup>	192,10 $\pm$ 30,29 <sup>ef</sup>	0,72 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>
350-400	37304,27 $\pm$ 0,00 <sup>e</sup>	302,48 $\pm$ 0,00 <sup>g</sup>	217,94 $\pm$ 0,00 <sup>f</sup>	0,73 $\pm$ 0,00 <sup>abcd</sup>
400-450	79254,60 $\pm$ 11920,32 <sup>f</sup>	411,36 $\pm$ 9,19 <sup>g</sup>	317,22 $\pm$ 23,92 <sup>g</sup>	0,78 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>

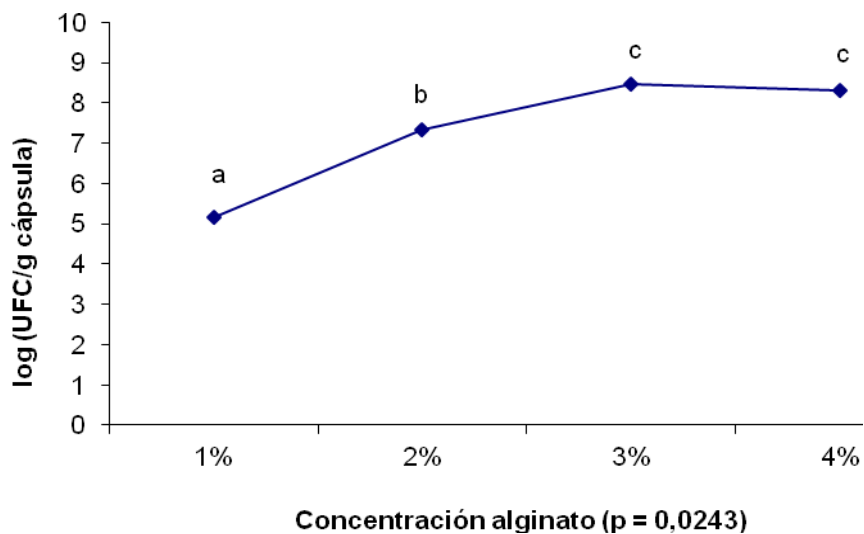
Los valores muestran la media  $\pm$  de. (n = 200). Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) para un mismo parámetro.

#### 4.2.2. Optimización del proceso de encapsulación.

Con el propósito de optimizar el método de microencapsulación en las microcápsulas de alginato para maximizar el rendimiento de encapsulación del probiótico pdp 11 se analizó qué efecto ejercía la concentración de alginato sódico y de cloruro cálcico sobre este parámetro.

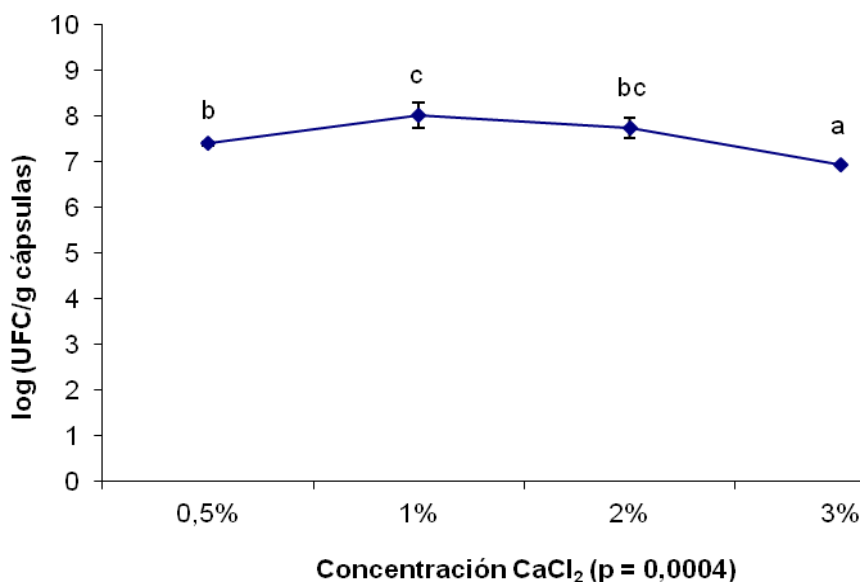
La Figura 18 muestra la influencia de la concentración de alginato en el rendimiento de encapsulación del probiótico. El aumento de la concentración de alginato llevó consigo un incremento significativo en el número de bacterias encapsuladas ( $p < 0,05$ ). Sin embargo a partir de un 3% de alginato se estabilizó el número total de bacterias encapsuladas. El valor máximo de bacterias encapsuladas fue de  $10^8$  UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de cápsula, siendo tres órdenes de magnitud superior al registrado cuando en la elaboración de las microcápsulas se utilizó una concentración alginato del 1% ( $p < 0,05$ ).





**Figura 18.** Influencia de la concentración de alginato sódico en el rendimiento de encapsulación. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 3$ ). Los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

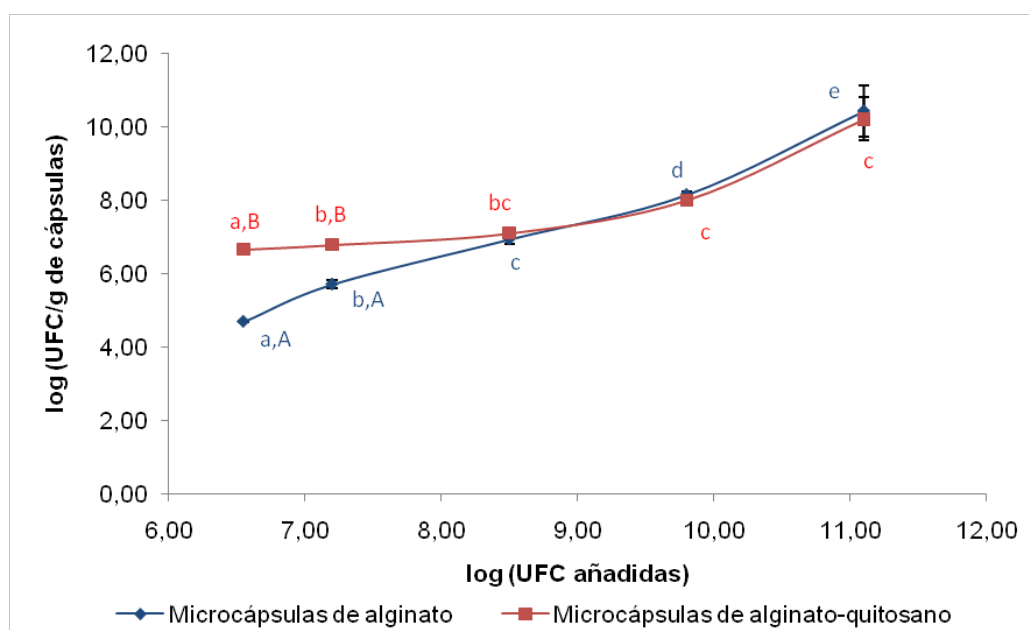
En la Figura 19 se puede observar la influencia de la concentración del cloruro cálcico en el rendimiento de encapsulación. El mayor número de bacterias encapsuladas se registró para concentraciones de cloruro cálcico comprendidas entre 1 y 2% ( $10^8$  UFC), mientras que concentraciones inferiores o superiores a éstas, determinaron un menor rendimiento ( $p < 0,05$ ), con valores medidos de aproximadamente un orden de magnitud inferior.



**Figura 19.** Influencia de la concentración de cloruro cálcico en el rendimiento de encapsulación. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 3$ ). Los valores con diferente índice indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3. Evaluación de la capacidad de carga de las microcápsulas.

El estudio de la capacidad de carga de las microcápsulas (Figura 20) reveló que los dos métodos de microencapsulación ensayados (alginato y alginato-quitosano) no presentaron diferencias significativas en cuanto al total de células encapsuladas cuando el total de bacterias utilizadas en el inóculo inicial fue superior a  $10^8$  UFC ( $p > 0,05$ ). Para un menor número de UFC en el inóculo de partida, las microcápsulas de alginato-quitosano ofrecieron mejores resultados que las de alginato, englobándose en el primer tipo de matriz un mayor número de bacterias ( $p < 0,05$ ). El máximo número de bacterias encapsuladas fue de  $10^{10}$  UFC/g microcápsulas cuando se utilizó un inóculo inicial de  $10^{11}$  UFC.

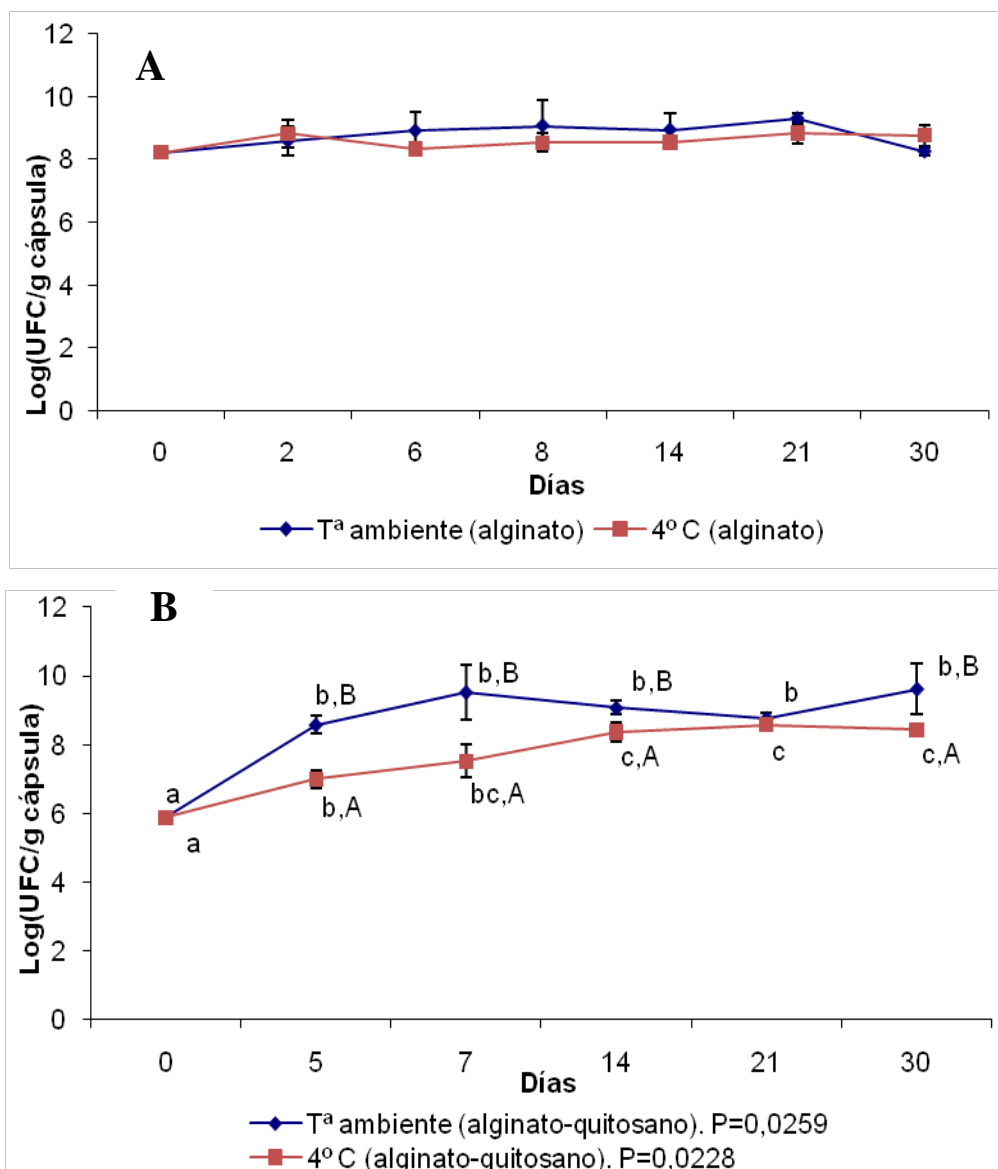


**Figura 20.** Capacidad de carga de las microcápsulas de alginato y alginato-quitosano. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 3$ ). Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para un mismo tipo de microcápsulas elaboradas con inóculos que contienen distinta concentración de bacterias (minúsculas) o entre los dos tipos de microcápsulas para una misma concentración de células en el inóculo (mayúsculas).

#### 4.2.4. Estabilidad de las microcápsulas en condiciones de almacenamiento.

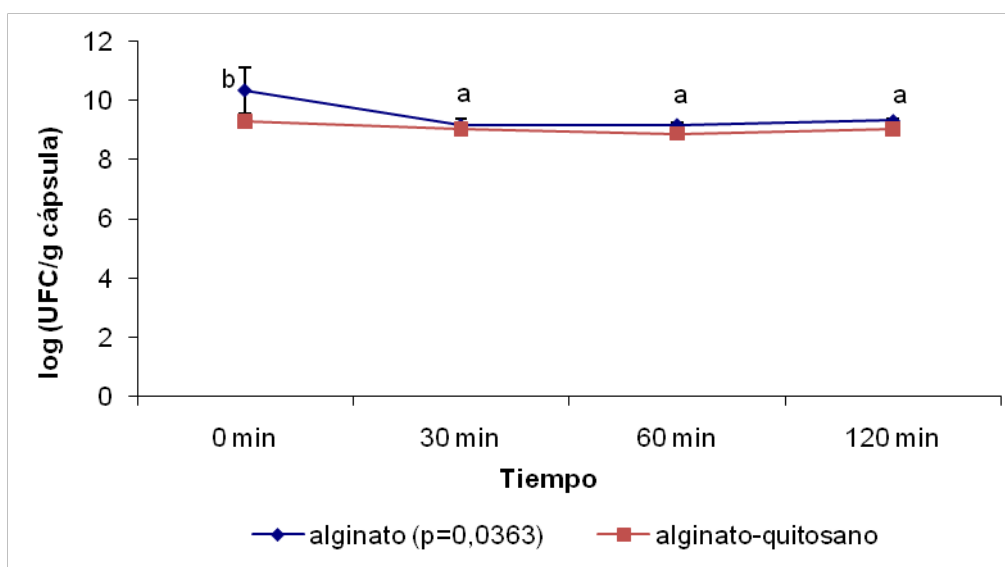
La viabilidad de las bacterias en las microcápsulas elaboradas con alginato (A) o con alginato-quitosano (B), y mantenidas a temperatura ambiente o  $4^{\circ}\text{C}$  se muestra en la Figura 21. Las bacterias encapsuladas en alginato no mostraron una reducción del recuento de bacterias viables, manteniéndose este valor estabilizado en torno a  $10^8$  UFC durante 30 días tanto en las microcápsulas conservadas a temperatura ambiente como en las mantenidas a  $4^{\circ}\text{C}$  ( $p > 0,05$ ).

Por otro lado, en las microcápsulas elaboradas con alginato-quitosano se observó un aumento significativo en el recuento de células viables tanto a temperatura ambiente como a 4 °C conforme lo hacía el tiempo de almacenamiento ( $p < 0,05$ ). Este incremento fue más rápido en las microcápsulas conservadas a temperatura ambiente, y más gradual para las que se mantuvieron a 4 °C. En ambos casos se produjo un aumento de entre 3 y 4 órdenes de magnitud con respecto al valor inicial de células encapsuladas, con valores finales significativamente mayores en las partículas almacenadas a temperatura ambiente ( $10^9$  UFC/g microcápsulas) con respecto a las mantenidas a 4 °C ( $10^8$  UFC/g microcápsulas) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 21.** Evolución de la viabilidad de las bacterias probióticas en las microcápsulas de alginato (A) y de alginato-quitosano (B).almacenadas a temperatura ambiente o a 4 °C. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. (n = 3). Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para un mismo tipo de microcápsulas a lo largo del tiempo (minúsculas) o entre los dos tipos de microcápsulas para un mismo día (mayúsculas).

La estabilidad de las microcápsulas en una disolución de cloruro sódico aparece representada en la Figura 22. En las microcápsulas elaboradas con alginato se apreció una disminución en el número de bacterias viables de aproximadamente un orden de magnitud a los 30 minutos ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, a partir de ese momento los recuentos de células viables permanecieron constantes durante todo el tiempo que permanecieron las microcápsulas sumergidas en solución salina (2 horas). Por otra parte, en las microcápsulas de alginato-quitosano no se produjo una disminución del recuento de células viables con respecto al número inicial de células probióticas encapsuladas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 22.** Estabilidad de las microcápsulas en solución salina. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 3$ ). Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para un mismo parámetro a lo largo del tiempo.

Finalmente, en la Tabla 9 se resumen los recuentos de células viables en las microcápsulas conservadas durante 2 semanas con distintos procedimientos (hidratadas, congeladas o liofilizadas). Los resultados obtenidos indican que no se produjo pérdida de la viabilidad de las bacterias cuando las microcápsulas (alginato y alginato-quitosano) se conservaron hidratadas a 4°C durante 14 días ( $p > 0,05$ ). En las microcápsulas congeladas a -20 °C se observó una disminución significativa en el recuento de células viables de aproximadamente tres órdenes de magnitud, en los dos tipos de microcápsulas ( $p < 0,05$ ). Finalmente, cuando las cápsulas fueron liofilizadas no se cuantificaron células viables en ningún caso.

**Tabla 9.** Evolución de la viabilidad de las bacterias probióticas en las microcápsulas con distintos procedimientos de conservación.

Microcápsulas	Días		
	0	7	14
<b>Alginato</b>			
Hidratadas,	9,39 ± 0,61	9,06 ± 0,13 <sup>B</sup>	9,13 ± 0,15 <sup>B</sup>
Congeladas	9,39 ± 0,61 <sup>b</sup>	6,03 ± 0,00 <sup>a,A</sup>	5,84 ± 0,12 <sup>a,A</sup>
Liofilizadas	9,39 ± 0,61	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Alginato- quitosano</b>			
Hidratadas	9,31 ± 0,30	9,31 ± 0,17 <sup>B</sup>	9,01 ± 0,10 <sup>B</sup>
Congeladas	9,31 ± 0,30 <sup>b</sup>	5,81 ± 0,11 <sup>a,A</sup>	6,28 ± 0,06 <sup>a,A</sup>
Liofilizadas	9,31 ± 0,30	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Los valores muestran la media ± d.e. (n = 3). Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para un mismo tipo de microcápsulas y forma de conservación a lo largo del tiempo (minúsculas) o para un mismo tipo de microcápsulas entre distintas formas de conservación para el mismo día (mayúsculas). Los resultados se expresan en log (UFC/g microcápsulas).

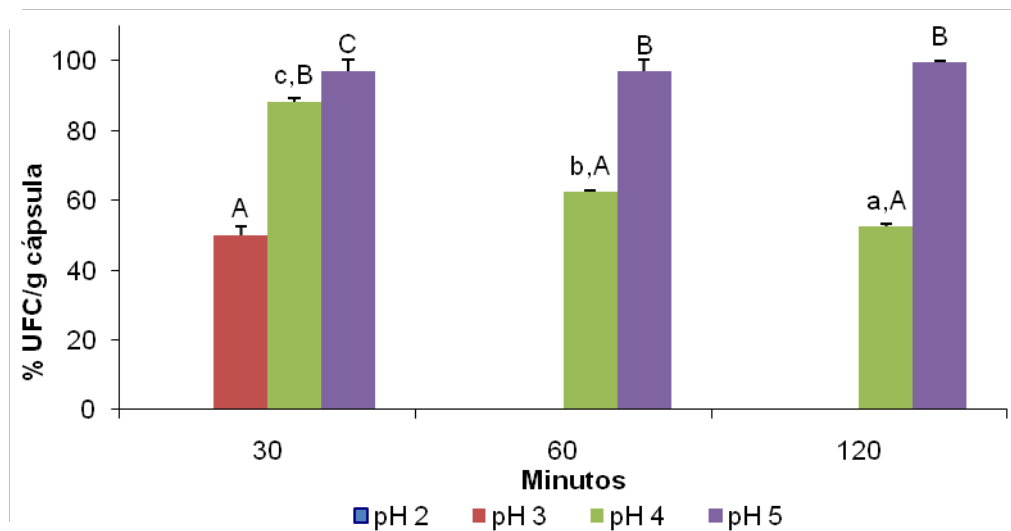
#### 4.2.5. Supervivencia de las bacterias encapsuladas en condiciones digestivas simuladas.

La estabilidad de las bacterias en las microcápsulas durante su tránsito por el sistema digestivo del pez es un factor importante para que las bacterias puedan alcanzar tramos posteriores del intestino y ejercer sus efectos beneficiosos. En este sentido, se evaluó la evolución de la viabilidad de las bacterias encapsuladas bajo distintas condiciones gastrointestinales de pez simuladas *in vitro*.

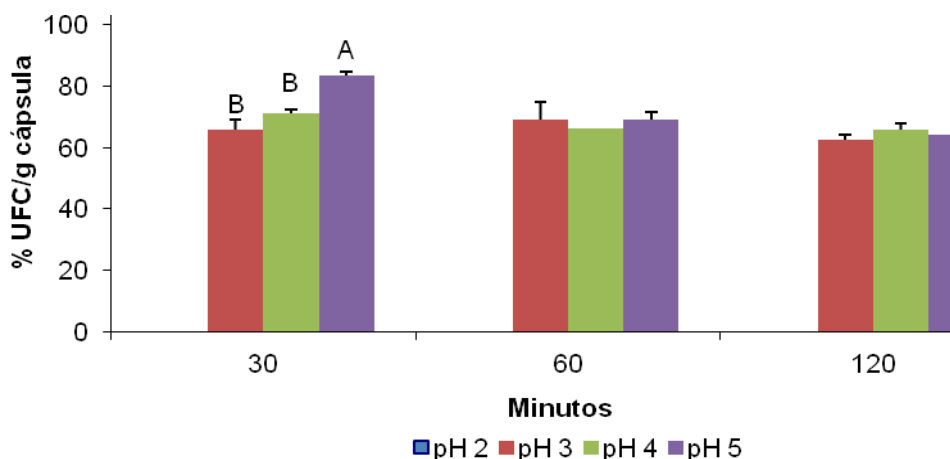
La Figura 23 muestra los resultados de la simulación gástrica. No se observó supervivencia alguna de las bacterias probióticas cuando la simulación se realizó a pH 2 para ninguno de los dos tipos de microcápsulas. Las bacterias encapsuladas con alginato solo se mantuvieron viables durante 30 minutos a pH 3 ( $p < 0,05$ ), mientras que las de alginato-quitosano conservaron el 60% de su viabilidad tras 120 minutos de simulación gástrica a este pH. Las cápsulas de alginato incubadas a pH 4 mostraron valores de supervivencia celular inferiores que a pH 5 ( $p < 0,05$ ), en torno al 50 % para el primero y cercanos al 100 % para el segundo. Por el contrario, para las cápsulas de alginato-quitosano se obtuvieron valores similares de

supervivencia (entorno al 60%) en ambos valores de pH, a excepción del valor registrado a los 30 minutos.

**A**



**B**

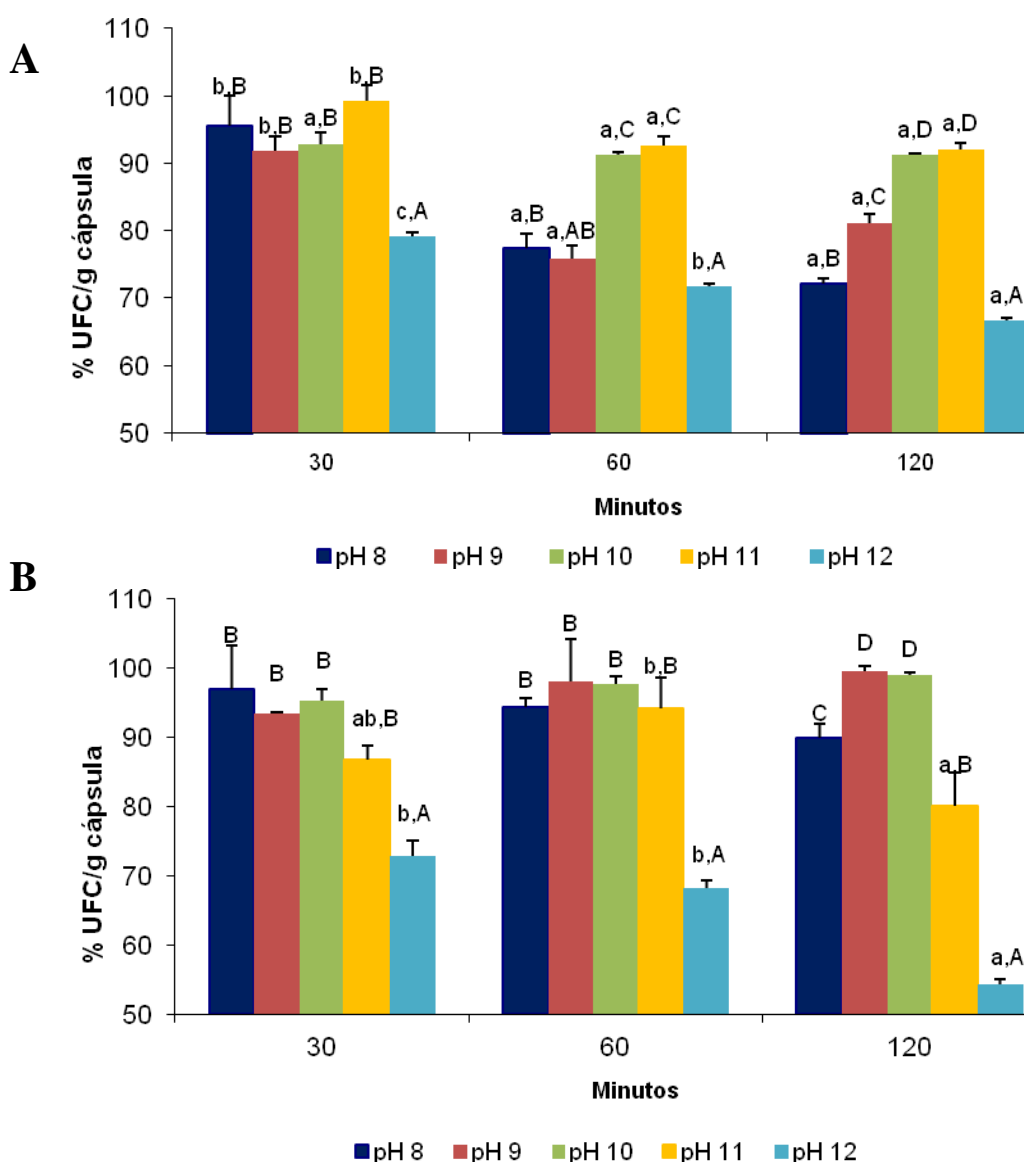


**Figura 23.** Evolución de la viabilidad de las células probióticas encapsuladas en microcápsulas de alginato (A) y alginato-quitosano (B) bajo condiciones estomacales (pH ácido) de pez simuladas. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 3$ ) del % de bacterias viables respecto al valor inicial de células encapsuladas. Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para un mismo valor de pH a lo largo del tiempo (minúsculas) o a diferentes valores de pH para un mismo tiempo (mayúsculas).

La Figura 24 muestra los resultados de simulación del ensayo realizado con valores de pH alcalino. A pH 12 se observó una clara disminución del porcentaje de bacterias viables en los dos tipos de microcápsulas a partir de los 30 minutos ( $p < 0,05$ ). Las microcápsulas de alginato registraron a los 60 minutos de incubación a pH 8 y 9 una disminución del porcentaje de bacterias en torno al 20 % ( $p < 0,05$ ), manteniéndose el número de células viables hasta el final del ensayo A pH 10 no se apreció una reducción significativa del porcentaje de bacterias

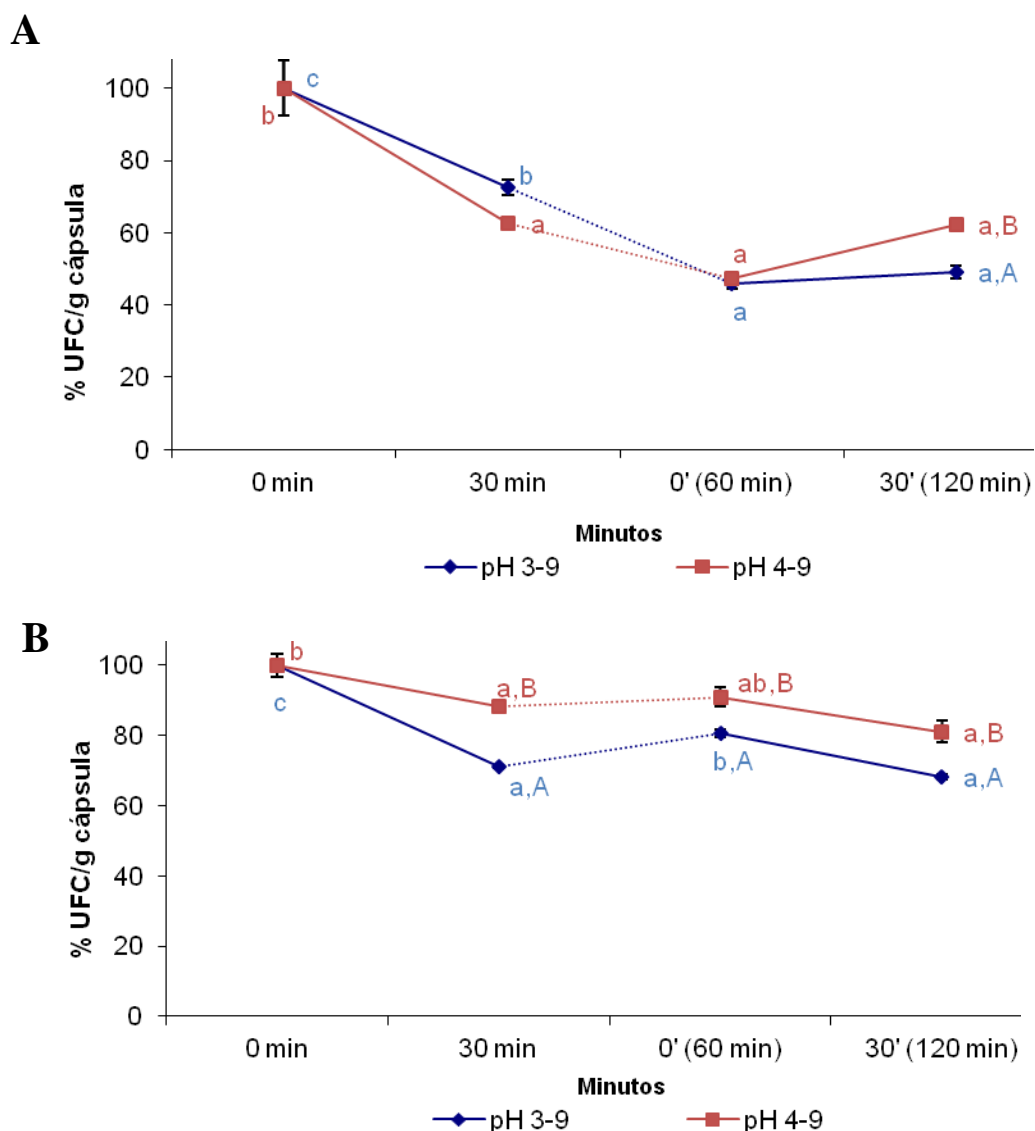
viables ( $p > 0,05$ ), y a pH 11 se pudo observar un ligera o descenso del 10 % con respecto al número total de bacterias encapsuladas ( $p < 0,05$ ).

Las microcápsulas del alginato-quitosano presentaron un comportamiento similar a las de alginato, si bien se comprobó una reducción significativa del recuento de células viables cuando se incubaron a pH 11 (20%) ( $p < 0,05$ ), y una menor pérdida de viabilidad en las células a pH 8 (10%) en comparación con las microcápsulas elaboradas con alginato ( $p < 0,05$ ).



**Figura 24.** Evolución de la viabilidad de las células probióticas encapsuladas en microcápsulas de alginato (A) y alginato-quitosano (B) bajo condiciones intestinales (pH alcalino) de pez simuladas. Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 3$ ) del % de bacterias viables respecto al valor inicial de células encapsuladas. Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para un mismo valor de pH a lo largo del tiempo (minúsculas) o a diferentes valores de pH para un mismo tiempo (mayúsculas).

Finalmente se estudió la viabilidad de las bacterias encapsuladas durante una simulación gastro-intestinal secuencial realizada con una fase ácida (pH 3 ó 4) seguida de otra etapa alcalina (pH 9). Las bacterias encapsuladas con alginato (Figura 25A) redujeron su supervivencia entre un 30 y 40 % a los 30 minutos en medio ácido ( $p < 0,05$ ). Cuando las cápsulas se transfirieron a un medio alcalino, se produjo otra pérdida adicional de bacterias viables conservándose finalmente entre el 50 y 60 % de las células viables tras 120 minutos de incubación a pH 9.



**Figura 25.** Evolución de la viabilidad de las células probióticas encapsuladas en microcápsulas de alginato (A) y alginato-quitosano (B) durante una simulación digestiva secuencial (fase ácida seguido otra alcalina). Los valores muestran la media  $\pm$  d.e. ( $n = 3$ ) del % de bacterias respecto al valor inicial. Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para un mismo valor de pH a lo largo del tiempo (minúsculas) o a diferentes valores de pH para un mismo tiempo (mayúsculas).



Por su parte en las cápsulas de alginato-quitosano (Figura 25B) la supervivencia de las células probiótica fue mayor en la fase ácida de pH 4 que en la de pH 3, aunque en ambos casos con valores superiores a los obtenidos en las cápsulas de alginato. La reducción de la supervivencia celular fue de aproximadamente un 10 % para las bacterias incubadas a pH 4 y de un 30 % para las de pH 3 ( $p < 0,05$ ), manteniéndose constante estos valores durante el resto del ensayo. En cualquier caso, la supervivencia registrada fue significativamente mayor en la simulación realizada a pH 4 que a pH 3 ( $p < 0,05$ ).

## 5. *DISCUSIÓN*

## **5.1. EVALUACIÓN *IN VIVO* DEL EFECTO DEL PROBIÓTICO INACTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA FISIOLÓGÍA DE JUVENILES DE LENGUADO SENEGALÉS.**

### **5.1.1. Evolución del crecimiento de los peces.**

En la actualidad una de las definiciones de probiótico en acuicultura más aceptadas por la comunidad científica es la de Verschuere *et al.* (2000): “complemento microbiano vivo que tiene un efecto beneficioso sobre el hospedador modificando la comunidad microbiana relacionada con él mismo o con el ambiente, asegurando un uso mejorado del alimento ó aumentando su valor nutricional, favoreciendo la respuesta del hospedador frente a las enfermedades ó mejorando la calidad del ambiente. Además Gatesoupe (1999) definió a los probióticos en acuicultura como “células microbianas administradas de tal manera que, en el tracto gastrointestinal se mantienen vivas con el objetivo de mejorar la salud” y Gram *et al.* (1999) como: “aquel suplemento vivo microbiano que afecta beneficiosamente al hospedador mejorando su balance microbiano”. Decir también que en una de las últimas revisiones realizadas sobre el uso de probióticos en acuicultura en el año 2010 por Merrifield *et al.* (2010) se ha propuesto una nueva definición del término más concreta y más ampliada: “célula microbiana viva, muerta ó componente celular que, al ser administrado vía alimentación ó en el agua de cultivo, beneficia al huésped, mejorando bien la resistencia frente a las enfermedades, bien el estado de salud, el crecimiento, la utilización de la dieta alimenticia, la respuesta al estrés ó el vigor en general, obteniéndose al menos en parte, una mejora en el balance microbiano del huésped ó del medio que le rodea.

Entre los posibles mecanismos de actuación de los probióticos se encuentran: la exclusión competitiva asociada a la producción de compuestos antimicrobianos tales como bacteriocinas, lisozimas y proteasas (Verschuere *et al.*, 2000; Makridis *et al.*, 2005), la competición por los nutrientes y la energía disponible (Gram *et al.*, 1999) ó por los puntos de adhesión a la superficie del huésped (Ringo *et al.*, 2010), la estimulación de la respuesta inmune (Balcázar *et al.*, 2006), la mejora del estado nutritivo del huésped mediante el aporte de enzimas, aminoácidos esenciales, péptidos, ácidos grasos, vitaminas, minerales, etc (de Moura *et al.*, 2009) y la inhibición de la expresión de genes de virulencia (Defoirdt *et al.*, 2007).

En particular, los efectos positivos del probiótico pdp 11 como promotor del crecimiento en peces marinos han sido descritos por diversos autores (Díaz-Rosales *et al.*, 2009; Sáenz de Rodrigañez *et al.*, 2009; Varela *et al.*, 2010). Estos autores han registrado un mayor crecimiento y una mejor utilización de los nutrientes en aquellos peces alimentados con piensos suplementados con probióticos en comparación con aquellos otros alimentados con un pienso control que no los incluye. En concreto, Sáenz de Rodrigañez *et al.* (2009) registraron un mayor crecimiento, mejores índices de conversión de alimento y aprovechamiento de la proteína en juveniles de lenguado senegalés cuando son alimentados con piensos que contienen el probiótico pdp 11 liofilizado. Este mayor crecimiento se ha asociado, entre otros, a la producción de enzimas como amilasas, proteasas y lipasas por parte de las bacterias que pueden favorecer el proceso digestivo, a la estimulación de la actividad enzimática digestiva del propio pez, y a una mayor absorción intestinal por parte de los enterocitos (Sáenz de Rodrigañez *et al.*, 2009).

Otros autores, sin embargo, no han obtenido una mejora significativa en los peces alimentados con este probiótico en relación al crecimiento, a otros parámetros zootécnicos o índices morfométricos de los peces, asociando estos resultados a las diferencias de temperatura entre ambos ensayos, ya que las dosis de probiótico ensayadas suelen estar siempre en torno a  $10^9$  UFC g<sup>-1</sup> alimento (García de La Banda *et al.*, 2010).

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros zootécnicos e índices morfométricos estudiados entre los peces alimentados con piensos que incluyen probiótico inactivo y los peces que ingirieron el pienso control ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, en todo momento se registraron valores de crecimiento, índices de conversión y morfométricos, así como ratios de eficiencia proteica similares o incluso mejores a los obtenidos por otros autores para esta misma especie (Rueda-Jasso *et al.*, 2004; Sáenz de Rodrigañez *et al.*, 2009; García de La Banda *et al.*, 2010).

Debido a que la cantidad de bacterias incorporadas a cada uno de los piensos experimentales utilizados en el presente estudio se ha demostrado efectiva por los autores anteriormente mencionados, las diferencias observadas en el crecimiento pueden ser debidas a la forma particular de incorporar el probiótico en el pienso en cada uno de estos estudios. En los casos anteriormente citados, la bacteria es incorporada al alimento de forma viable con un recubrimiento de alginato cálcico, protegiéndola de las condiciones adversas que se va a

encontrar tanto durante el almacenamiento como en su recorrido por el aparato digestivo del pez. Este recubrimiento de alginato cálcico permite que la bacteria llegue en la concentración deseada al intestino y sea posible su colonización.

En el presente trabajo, la bacteria liofilizada e inactivada por calor fue directamente añadida a los piensos experimentales como un aditivo más, y sin recubrimiento alguno de alginato, por lo tanto es de suponer que el hecho de que no se registrara un mayor crecimiento en los juveniles de lenguado es debido a que la bacteria inactiva no ejerce el mismo efecto beneficioso que cuando se incorpora de forma viable, a pesar de que la cantidad de probiótico incorporado es muy elevada (llegando a utilizarse hasta un 5% de liofilizado de pdp 11 inactivo).

### **5.1.2. Evaluación del estado inmune de los peces.**

Diversos estudios han demostrado la habilidad de diferentes bacterias de presentar actividad *in vitro* frente a diversos patógenos, así como la capacidad de los probióticos para estimular la respuesta inmune inespecífica de los peces (Panigrahi *et al.*, 2007; Brunt *et al.*, 2008; Merrifield *et al.*, 2010).

En concreto, se ha comprobado que la inclusión en el alimento del probiótico pdp 11 incrementa la actividad oxidativa en ejemplares juveniles de lenguado senegalés, inhibiendo el crecimiento *in vitro* del patógeno *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Chabrilón *et al.*, 2005) y disminuyendo la mortalidad de los peces (Díaz-Rosales *et al.*, 2009; García de la Banda *et al.*, 2010). Este efecto, sin embargo, no ha sido observado en peces alimentados con piensos suplementados con otras especies del género *Shewanella*, como *S. baltica* pdp 13 (Díaz-Rosales *et al.*, 2009). Por otro lado, el probiótico pdp 11 inactivado por calor no ha mostrado influencia en el estado inmune cuando se aplica en ejemplares juveniles de dorada (Salinas *et al.*, 2006).

Para estudiar el efecto del probiótico pdp 11 inactivado por calor en el estado inmune inespecífico de los juveniles de lenguado se analizaron en el suero y/o plasma de los peces la concentración plasmática de inmunoglobulinas totales, la actividad antitripsina, los niveles de actividad de fosfatasa alcalina y lisozima, y la actividad antimicrobiana del suero.

A pesar de no encontrarse diferencias significativas en la concentración de proteína plasmática ( $p > 0,05$ ), la concentración de inmunoglobulinas totales se incrementó de forma gradual conforme lo hizo la cantidad de probiótico añadido al pienso experimental. Este hecho viene a corroborar lo encontrado por otros autores, ya que los probióticos tienen la capacidad, tanto *in vivo* como *in vitro*, de estimular la proliferación de linfocitos B, elevando los niveles de inmunoglobulinas en diversas especies de peces (Nayak, 2010), y así favorecer una mayor resistencia de los peces frente a los microorganismos patógenos.

En contra de lo expuesto anteriormente, los niveles de actividad antitripsina en el suero y plasma de los ejemplares juveniles de lenguado senegalés mostraron una tendencia opuesta. Mientras que los niveles de inhibición en las muestras de suero no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), el porcentaje de inhibición obtenido con las muestras de plasma fue menor en los tratamientos con mayor concentración de probiótico ( $p < 0,05$ ). A pesar de que esta actividad es habitualmente elevada en peces y difícil de modular, incluso después de la infección, ciertos probióticos han sido capaces de elevar esta actividad en peces (Nayak, 2010), aunque en otros casos no se ha descrito tal efecto (Varela *et al.*, 2010). En el caso concreto del probiótico pdp 11 inactivo, y a diferencia de cuando las células se utilizan vivas, no parece que la administración de este preparado ocasione un incremento de esta actividad en los juveniles de lenguado senegalés.

Los niveles de las actividades fosfatasa alcalina y lisozima no presentaron diferencias significativas entre los peces alimentados con los piensos que incluyen el probiótico y los del control. Se ha descrito que los peces que poseen niveles de actividad fosfatasa alcalina relativamente bajos suelen presentar síntomas de desnutrición o de deficiencias en algún mineral. Panigrahi *et al.* (2010) registraron valores más altos de fosfatasa alcalina en trucha arcoiris cuando se administró el probiótico *Lactobacillus rhamnosus*. Sin embargo, este incremento solo se obtuvo en los peces alimentados con el probiótico vivo, ya que al ser aplicado de forma inactivada no se produjo un aumento significativo en esta actividad ( $p > 0,05$ ). En el presente estudio se han obtenido resultados similares a los descritos por este autor, lo que sugiere que cuando pdp 11 se administra como un preparado de células inactivas, éste no produce un incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina plasmática.

Por otro lado, la actividad lisozima es una herramienta importante en la respuesta inmune inespecífica de los peces para luchar contra agentes infecciosos. Se ha demostrado que los

probióticos son capaces de incrementar la actividad lisozima en teleósteos (Nayak, 2010), tanto en el suero como en las mucosas de los peces (Taoka *et al.*, 2006). Sin embargo, los cambios en la actividad lisozima presentan resultados contradictorios en diferentes estudios, ya que algunos autores describen que no se produce un incremento en dicha actividad en peces alimentados con probióticos, o al igual que en el presente trabajo, han llegado incluso a registrar un descenso en sus niveles de actividad (Costas *et al.*, 2011). Tampoco parece que la administración del probiótico pdp 11 en forma inactiva incremente la actividad lisozima de los juveniles de lenguado senegalés. Este hecho pone de manifiesto que la respuesta por parte del pez es muy diferente según se administre dicho probiótico en forma viable o inactiva.

Los sueros de los peces alimentados con probiótico inactivo mostraron una mayor inhibición de las células de un cultivo estándar de *Areomonas hydrophila* ( $p < 0,05$ ). Así el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en los recuentos efectuados cuando el inóculo estándar de este patógeno se incubó con los sueros de los peces alimentados con piensos que incluyen pdp 11 fue menor en comparación con los recuentos realizados con los sueros de los peces del control. La actividad bactericida del suero es un mecanismo importante de la respuesta inmune inespecífica, ya que es responsable de la eliminación directa de microorganismos mediante su lisis (Nayak, 2010). Estos resultados confirman los obtenidos por otros autores, demostrando el efecto beneficioso que ejerce el probiótico pdp 11 para estimular la capacidad del pez para inhibir el crecimiento de patógenos (Díaz-Rosales *et al.*, 2009; García de la Banda *et al.*, 2010).

En general, la administración del probiótico pdp 11 como un preparado de células inactivas no afectó por igual al conjunto de parámetros analizados. A pesar de ello, se produjo un incremento significativo de la concentración de inmunoglobulinas totales y la actividad antimicrobiana en los ejemplares juveniles de lenguado senegalés, lo que manifiesta que se produce una mejora en el estado inmune inespecífico del pez, aunque los efectos que ejerce el probiótico sobre los parámetros de inmunidad inespecíficos dependen del modo en que éste se administre a los peces.

#### 5.1.2.1. Evaluación de los metabolitos plasmáticos y del hematocrito.

Para evaluar el estado general de los peces, además de los parámetros anteriormente estudiados, se cuantificaron los niveles de colesterol y triglicéridos en el plasma. Se ha

demostrado que el nivel de estos metabolitos es un buen indicador indirecto del estado de salud de los peces (Maita *et al.*, 2002), y por lo tanto de su tolerancia frente al estrés o a infecciones causadas por agentes patógenos.

Estudios realizados por Panigrahi *et al.* (2010) demostraron que la administración de piensos suplementados con probióticos eleva los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos, así como el valor del hematocrito. Los resultados obtenidos por estos autores ponen de manifiesto un mayor incremento en el valor de estos parámetros cuando el probiótico se incorpora vivo en el alimento, mientras que cuando se hace de forma inactiva, este aumento se da, pero es de menor magnitud, y no presenta diferencias significativas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que, a pesar de que los niveles de colesterol y triglicéridos no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ), el hecho de que los valores medios de ambos parámetros sean más altos en los animales que han ingerido una dosis mayor de probiótico inactivo sugiere cierta mejora en su estado general en comparación con el control.

### **5.1.3. Evaluación de las actividades enzimáticas digestivas.**

Los niveles de actividad de varias enzimas digestivas se han utilizado como indicadores del estado de condición de las larvas (Lemieux *et al.*, 1999; Cara, 2005; Engrola *et al.*, 2007) y para evaluar la capacidad digestiva de los ejemplares adultos (Alarcón *et al.*, 1998). En el presente estudio se aborda el análisis de estas enzimas desde dos perspectivas distintas: i) las actividades proteasa ácida total, proteasa alcalina total, y tripsina como indicadores de la capacidad digestiva de los peces; y ii) las actividades aminopeptidasa y fosfatasa alcalina como indicadores de la funcionalidad de la mucosa intestinal.

En particular, en el lenguado senegalés la relación entre los niveles de actividad proteasa ácida (estomacal) y los de actividad proteasa alcalina (intestinal) no se asemejan a los descritos para otras especies carnívoras, ya que estos últimos suelen presentar niveles más altos de proteasas ácidas en comparación con otras especies omnívoras o herbívoras (Alarcón *et al.*, 1998; Essed *et al.*, 2002). Una menor importancia relativa de la actividad proteasa ácida en el estómago indica que en *S. senegalensis* la fase de digestión ácida parece tener un menor papel en el proceso de digestión global (Sáenz de Rodríguez *et al.*, 2005).



Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la incorporación de pdp 11 inactivo en el alimento no ejerce ningún efecto en los niveles de actividad proteasa ácida, ni en la actividad proteolítica alcalina total del intestino proximal ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, los peces alimentados con el pienso control presentaron mayores niveles de actividad proteasa en el intestino distal en comparación con los del resto de tratamientos ( $p < 0,05$ ). La actividad tripsina siguió la misma tendencia. El hecho de que, en general, todos los peces presentaran crecimientos similares hace pensar que tales diferencias no estén relacionadas con un mayor o menor aprovechamiento de los alimentos. Por otro lado, se ha descrito que los probióticos pueden producir cofactores que ayudan a las enzimas del hospedante a hidrolizar los nutrientes al incrementar la velocidad de las reacciones enzimáticas, por lo que en estas condiciones se podría asumir que la reducción de la secreción de enzimas no afectaría al proceso digestivo (Sirvas-Cornejo *et al.*, 2007). En estas circunstancias los probióticos incrementarían la eficiencia del proceso digestivo en el pez y, por tanto, los peces del tratamiento control, para poder aprovechar el alimento, deberían de presentar mayores niveles de actividad en tramos posteriores del intestino en comparación con los peces que ingieren probióticos con el alimento. Sin embargo, en contra de lo anterior también se ha descrito que los probióticos estimulan la producción de enzimas digestivas (Sáenz de Rodríguez *et al.*, 2009). En cualquier caso, es necesario un estudio mucho más profundo para dilucidar cuál puede ser la hipótesis correcta.

Los niveles de la actividad aminopeptidasa no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, ni en el intestino proximal ni en el distal ( $p > 0,05$ ). En cambio, la actividad fosfatasa alcalina en el intestino proximal fue significativamente mayor en los animales alimentados con P-5 ( $p < 0,05$ ), mientras que en el intestino distal, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). En este sentido, Sáenz de Rodríguez *et al.* (2009) tampoco obtuvieron diferencias importantes en los niveles de actividad aminopeptidasa y fosfatasa alcalina cuando administraron pdp 11 viable a los ejemplares juveniles de lenguado, aunque en su estudio sí que registraron una mejor utilización de nutrientes en estos peces. Se sabe que las actividades aminopeptidasa y fosfatasa alcalina están relacionadas con los procesos de absorción y transporte a través de los enterocitos (Zambonino-Infante y Cahu, 2001), y que son indicadores de la funcionalidad del epitelio intestinal. Por lo tanto, el hecho de que los peces alimentados con P-5 presenten mayores niveles de actividad fosfatasa alcalina podría estar relacionado con un buen estado del epitelio intestinal en estos animales.

## **5.2. OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA ELABORAR MICROCÁPSULAS QUE INCLUYAN AL PROBIÓTICO.**

### **5.2.1. Caracterización morfológica de las microcápsulas.**

El tamaño medio de las microcápsulas es un factor importante para su estabilidad y su capacidad para proteger al probiótico. Las microcápsulas más pequeñas, con diámetros entre 40 y 80  $\mu\text{m}$ , se han demostrado ineficaces a la hora de proteger a las bacterias probióticas en medio ácido; mientras que las de mayor tamaño (1-3 mm) le confieren una mejor protección. Por otra parte, las microcápsulas de mayor tamaño son demasiado grandes para añadirlas al alimento sin que se vea afectada la textura de éste, y presentan una peor capacidad para dispersar el contenido, mientras que las más pequeñas contienen menor cantidad de probiótico (Annan *et al.*, 2007; Rosas-Ledesma *et al.*, 2011). Por lo tanto es necesario llegar a un tamaño de partículas óptimo que permita tanto una buena protección como una correcta distribución del probiótico en el tracto intestinal.

Con el protocolo de microencapsulación utilizado predominaron las partículas con un diámetro comprendido entre 100 y 150  $\mu\text{m}$ , siendo el diámetro medio de  $101,36 \pm 12,52 \mu\text{m}$ . En la mayoría de los estudios se preparan microcápsulas con diámetros inferiores a 100  $\mu\text{m}$  (Annan *et al.*, 2007). En cuanto a su morfología, las microcápsulas de menor tamaño presentaron una mayor esfericidad que las microcápsulas de mayor tamaño, presentando estas últimas forma de lágrima. Esto es debido a que su mayor contenido de alginato les confiere una mayor viscosidad que unido a la fuerza centrífuga aplicada durante su preparación, determina que presenten esta forma característica. Debido a la gran dispersión de tamaños registrada entre las microcápsulas cabe plantearse que es necesario ajustar otros parámetros tales como la velocidad de agitación, volumen entre la solución de alginato y la fase dispersante que permitan conseguir una mayor homogeneidad en el tamaño de las partículas.

### **5.2.2. Optimización del proceso de encapsulación.**

El rendimiento de encapsulación del probiótico se incrementó conforme aumentó la concentración de alginato, hasta  $10^8$  UFC por gramo de microcápsula cuando se utilizó una concentración de alginato sódico del 3%. Sin embargo a partir de un 3% de polímero se

estabilizó el número total de bacterias encapsuladas. Por su parte, la concentración del cloruro cálcico no influyó de forma significativa en el rendimiento de encapsulación. Cuando se utilizaron concentraciones de cloruro cálcico comprendidas entre 1 y 2% se pudieron elaborar microcápsulas que contenían un mayor número de bacterias ( $10^8$  UFC) ( $p < 0,05$ ), mientras que las concentraciones inferiores o superiores a este rango, ocasionaron un menor rendimiento de encapsulación ( $p < 0,05$ ).

La concentración de alginato utilizada en la preparación de microcápsulas varía ampliamente desde 0,5 % a 4 % dependiendo de los autores (Chandramouli *et al.*, 2004). Diversos estudios han demostrado que el aumento en la concentración de alginato se traduce en una mayor supervivencia del probiótico (Chandramouli *et al.*, 2004; Mandal *et al.*, 2006). Rosas-Ledesma *et al.* (2011) no registraron grandes diferencias en el rendimiento de encapsulación al preparar microcápsulas con concentraciones de alginato comprendidas en el rango de 1 a 4%. Sin embargo los mismos autores registraron una disminución en el número de bacterias encapsuladas conforme se incrementa la concentración de cloruro cálcico de la solución polimerizante.

El incremento del número de bacterias encapsuladas que se producen al aumentar la concentración de alginato es debido al tipo de interacción que se produce entre el alginato sódico y el cloruro cálcico. El calcio (carga positiva) forma enlaces iónicos con el alginato (carga negativa), originándose una red en la que quedan atrapadas las bacterias. A mayor concentración de alginato, mayor será el número de enlaces iónicos que se producen y más espacio habrá en la matriz para retener células bacterianas, siempre hasta un cierto límite que en el presente estudio se produce para concentraciones de alginato superiores al 3 %. El mismo fenómeno se produce al incrementar la concentración de cloruro cálcico. La disminución en el rendimiento de encapsulación observada con concentraciones elevadas de cloruro cálcico se debe a que se originan un mayor número de enlaces entre el alginato y el calcio, y esto provoca que los espacios en la matriz resultante sean menores y, por lo tanto, sea posible albergar en ella a un menor número de bacterias.

### **5.2.3. Evaluación de la capacidad de carga de las microcápsulas.**

Para que las bacterias probióticas puedan sobrevivir y alcancen el intestino en un número suficiente para ejercer sus efectos beneficiosos es necesario que un número elevado de ellas

puedan ser englobadas en las microcápsulas. El incremento en la concentración de bacterias durante su microencapsulación se traduce en un mayor número de bacterias supervivientes, aunque concentraciones demasiado elevadas debilitan la estructura tridimensional del gel (Chandramouli *et al.*, 2004).

En el estudio de la capacidad de carga de las microcápsulas se reveló que no había diferencias en el número de células encapsuladas entre los dos métodos de microencapsulación ensayados cuando el total de bacterias utilizadas en el inóculo inicial fue superior a  $10^8$  UFC ( $p > 0,05$ ). Las microcápsulas de alginato-quitosano ofrecieron mejores resultados cuando se utilizan un menor número de UFC en el inóculo inicial, pero para la dosis del probiótico pdp 11 que se ha demostrado efectiva en *S. senegalensis*, ( $10^9$  UFC) (Díaz-Rosales *et al.*, 2009; García de La Banda *et al.*, 2010), ambos tipos de microcápsulas pueden ser utilizadas indistintamente, garantizándose rendimientos de encapsulación equivalentes.

#### **5.2.4. Estabilidad de las microcápsulas en condiciones de almacenamiento.**

El estudio de la viabilidad de las bacterias en las microcápsulas a temperatura ambiente y a 4 °C mostró que las bacterias encapsuladas en alginato mantuvieron los recuentos de bacterias viables estabilizados en torno a  $10^8$  UFC durante 30 días tanto en las microcápsulas conservadas a temperatura ambiente como en las mantenidas a 4 °C ( $p > 0,05$ ).

En las microcápsulas elaboradas con alginato-quitosano se observó un incremento en los recuentos de células viables tanto a temperatura ambiente como a 4 °C a medida que lo hacía el tiempo de almacenamiento ( $p < 0,05$ ). Este incremento fue más rápido en las microcápsulas conservadas a temperatura ambiente, estabilizándose el recuento de células viables en  $10^9$  UFC/g microcápsulas, y más gradual para las que se mantuvieron a 4 °C, con valores finales de  $10^8$  UFC/g microcápsulas. Este incremento pudo ser debido a que, como el número de bacterias encapsuladas inicialmente en este tipo de microcápsulas fue inferior, éstas se multiplicaron en el interior de las microcápsulas ocupando todos los espacios disponibles hasta alcanzar la carga máxima de éstas y, como es obvio, de forma mucho más rápida cuando las partículas se almacenaron a temperatura ambiente.

En lo referente al modo de conservación, las microcápsulas (tanto de alginato como de alginato-quitosano) que se conservaron hidratadas a 4 °C no mostraron pérdida de la viabilidad de las bacterias durante 14 días. Rosas-Ledesma *et al.* (2011) registraron una

supervivencia del 90 % del probiótico pdp 11 cuando este era almacenado durante un mes a 4 °C. Sin embargo, los mismos autores observaron que la viabilidad de las bacterias disminuyó un 40 % al ser almacenadas a 22 °C. Esto es debido a que a baja temperatura se produce una disminución del metabolismo de la bacteria y una menor acumulación de productos tóxicos derivados de él.

Las microcápsulas congeladas a -20 °C presentaron una importante disminución en el recuento de bacterias viables, mientras que en las microcápsulas liofilizadas no se pudo cuantificar ninguna células viable, lo que evidencia que este último método no es un procedimiento viable para conservar al probiótico pdp 11 de forma viable en las partículas. Callewaert *et al.* (2007) también registraron una menor resistencia de las células bacterianas en las cápsulas de alginato cálcico tras su congelación y liofilización.

Finalmente el estudio de estabilidad de las bacterias encapsuladas en una disolución de cloruro sódico reflejó una disminución inicial en el número de bacterias viables en las microcápsulas elaboradas con alginato ( $p < 0,05$ ), tras lo cual se mantuvo el recuento de viables constante. Por su parte, en las microcápsulas de alginato-quitosano no se produjo tal reducción ( $p > 0,05$ ). En este sentido, Silva *et al.* (2006a) describieron que se produce una liberación más lenta del contenido de las microcápsulas tratadas con quitosano en comparación con las microcápsulas cuya matriz únicamente contiene alginato, debido a que el hidrogel de alginato-quitosano es más estable y confiere mayor protección a las células retenidas en el mismo.

Por lo tanto, las microcápsulas de alginato-quitosano parecen ser las más indicadas para mantener la viabilidad del probiótico pdp 11 durante su almacenamiento en forma hidratada, o para su administración en el medio acuático.

### **5.2.5 Supervivencia de las bacterias encapsuladas en condiciones digestivas simuladas.**

En general, los resultados obtenidos corroboran que las microcápsulas de alginato-quitosano ofrecen una mejor protección de las bacterias probióticas frente a las condiciones gastrointestinales simuladas. Igualmente, los resultados de la simulación digestiva secuencial, confirmaron que este tipo de microcápsulas ofrecen una mayor protección del probiótico pdp 11 en condiciones digestivas simuladas.

Se ha demostrado que las bacterias probióticas encapsuladas en alginato cálcico presentan una mayor supervivencia a las condiciones gastrointestinales que las células libres (Chandramouli *et al.*, 2004; Mandal *et al.*, 2006; Annan *et al.*, 2007; Alarcón *et al.*, 2010). Sin embargo, en muchas ocasiones, la supervivencia del probiótico es todavía inferior a la deseada por lo que es necesario incrementar la capacidad de las microcápsulas para proteger al probiótico en condiciones adversas. Para disminuir la porosidad de las cápsulas de alginato e incrementar su resistencia se ha ensayado con el recubrimiento de las microcápsulas con diversos polímeros catiónicos, como el quitosano. El recubrimiento de las microcápsulas de alginato con quitosano se ha demostrado efectivo para disminuir la erosión de la pared de alginato y para conseguir una mayor retención del contenido de las microcápsulas. Además de esto, se ha observado que el quitosano incrementa la absorción de ciertas partículas por las células epiteliales debido a sus propiedades de mucoadhesión que incrementan el contacto de las partículas con las mucosas (Silva *et al.*, 2006a y b).

En cualquier caso, para ahondar en estos aspectos se requiere la realización de ensayos *in vivo* con animales a partir de los cuales se pueda extraer información que permita complementar a la obtenida en las simulaciones gastrointestinales realizadas *in vitro* y permita establecer los protocolos más adecuados para administrar estas bacterias probióticas a cada especie en particular.

## 6. *CONCLUSIONES*

1- La administración oral con el alimento del probiótico *Shewanella* pdp 11 en forma inactiva no ejerce, a las dosis ensayadas, ningún efecto sobre el crecimiento de los juveniles de lenguado senegalés.

2- La administración de células inactivas del probiótico *Shewanella* pdp 11 con el alimento produce una mejora del estado inmune inespecífico de los ejemplares juveniles de lenguado senegalés, aunque dicho efecto beneficioso no se observa en todos los parámetros de inmunidad inespecíficos analizados, lo que indica que el modo en que se administre este probiótico influye en la intensidad y magnitud de la respuesta inmunitaria del pez.

3- La administración del probiótico *Shewanella* pdp 11 modifica los niveles de actividad de las enzimas intestinales de los ejemplares juveniles de lenguado senegalés, no obstante no se evidencia que estas variaciones tengan repercusión en el aprovechamiento digestivo del alimento.

4. Se ha desarrollado un procedimiento para preparar microcápsulas de alginato y alginato-quitosano que permiten vehicular células probióticas *Shewanella* pdp 11 viables.

5- Las microcápsulas de alginato y alginato-quitosano mantienen la viabilidad del probiótico *Shewanella* pdp 11 en condiciones de almacenamiento durante 30 días, cuando las microcápsulas se conservan de forma hidratada.

6- Las microcápsulas de alginato-quitosano resultan más apropiadas para administrar el probiótico *Shewanella* pdp 11 a peces provistos de estómago.

6. CONCLUSIÓN FINAL: La administración de células inactivas de *Shewanella* pdp 11 no mejora el crecimiento de los ejemplares juveniles de lenguado senegalés, pero si su estado inmune. Por otra parte, la microencapsulación de este probiótico supone una herramienta de enorme potencial para su administración en fases más tempranas del cultivo de esta especie.



## ***BIBLIOGRAFÍA***

---

- Alarcón, F. J. 1997. Procesos digestivos en peces marinos. Caracterización y aplicaciones prácticas. Tesis doctoral. Universidad de Almería. Almería, España: 325 pp.
- Alarcón, F. J. y M. I. Martínez, 1998. Fisiología de la digestión en larvas de peces marinos y sus aplicaciones al cultivo larvario en masa. *AquaTIC*, 5.
- Alarcón, F. J., M. Díaz, F. J. Moyano y E. Abellán. 1998. Characterization and properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry* 19: 257-267.
- Alarcón, F. J., D. Martínez, T.F. Martínez, M.C. Balebona y M.A. Moriñigo. 2010. Encapsulation of a potential fish probiotic bacteria in Ca-alginate beads. XVIII International Conference on Bioencapsulation. Porto, Portugal- October 1-2, 2010.
- Annan, N.T., L. Borza, T. Hansen. 2007. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, doi:10.1016/j.foodres.2007.11.001.
- Arijo, S.; R. Rico; M. Chabrillon; P. Díaz-Rosales; E. Martínez-Manzanares; M. C. Balebona; B. Magariños; A. E. Toranzo y M. A. Moriñigo. 2005. Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela subsp piscicida*. *J. Fish Dis.* 28: 33-38.
- Balcázar, J.L., I. de Blas, I. Ruíz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell y J. L. Múzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*: 114: 173-186.
- Bergmeyer, H. V. 1974. Phosphatase. En: Methods of enzymatic analysis. H. S. Bergmeyer (ed.) 2: 856-860. *Verlag Chemie Academic Press*. Nueva York.
- Bengtén, E., M. Wilson, N. Miller, L.W. Clem, L. Pilstrom y G.W. Warr. 2000. Immunoglobulin isotypes: structure, function and genetics. *Current topics in Microbiology and Immunology* 248, 189-219.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254

- Brunt, J., R. Hansen, D.J. Jamieson *et al.* 2008. Proteomic analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) serum after administration of probiotics in diets. *Vet Immunol Immunopathol* 121:199-205.
- Callewaert, M., D. Laurent-Maquin, F. Edwards-Lévy. 2007. Albumin–alginate-coated microspheres: Resistance to steam sterilization and to lyophilization. *International Journal of Pharmaceutics*, 344: 161-164.
- Cañavate, J. P. y C. Fernández-Díaz. 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto comercial dry feeds. *Aquaculture*, 174: 255-263.
- Cañavate, J. P. 2005. Opciones del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) para diversificar la acuicultura marina. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21 (1-4). 2005: 147-154.
- Chabrilón, M.; S. Rico; M.C. Balebona *et al.* 2005. Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J Fish Dis.* 28: 229-237
- Chandramouli, V., K. Kailasapathy, P. Peiris y M. Jones. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. In simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56: 27-35.
- Costas, B.; L.E.C. Conceição; C. Aragao; J.A. Martos; I. Ruiz-Jarabo; J.M. Mancera y A. Alfonso. 2011. Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: Effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. *Aquaculture*, 316: 68-76.
- Day, O. J.; B. R. Howell; A. Aksnes y E. Nygard. 1999. Recent advances in the weaning of sole, *Solea solea* (L.). En: *Abstracts of contributions presented at the International Conference Aquaculture Europe 1999. EAS Special Publication*, 27: 40-41.
- Defoirdt, T., N. Boon, P. Sorgeloos, W. Verstraete, y P. Bossier. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology* 25, 472-479.
- de Moura, R. S., E. D. O. S. Saliba, F. Q. de Almeida, A. M. Q. Lana, V. P. Silva y A. S. C. de Rezende. 2009. Feed efficiency in Mangalarga Marchador foals fed diet supplemented with probiotics or phytase. *R. Bras. Zootec.*, 38, 1045-1050.

- Díaz-Rosales, P. 2006. Papel de las actividades superóxido dismutasa y catalasa en la virulencia de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Estrategias para la estimulación del estallido respiratorio en fagocitos de lenguados cultivados. Departamento de Microbiología, p. 150. Málaga: Universidad de Málaga.
- Díaz-Rosales, P.; S. Arijo; M. Chabrilón; F.J. Alarcón; S. Tapia-Paniagua; E. Martínez-Manzanas; M.C. Balebona; M.A. Moriñigo; 2009. Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, 293: 16-21.
- Dinis, M. T. y J. Reis. 1995. Culture of *Solea* spp. *Cahier Options Mediterranees*, Marine Aquaculture Finfish Species Diversification, 16:9-19.
- Dinis, M. T.; L. Ribeiro; F. Soares y C. Sarasquete. 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and Portugal. *Aquaculture*, 176: 27-38.
- Divanach, P. 2003. New Species in Mediterranean, Dream or Reality. PROFET Workshop. RTD needs in Mediterranean fish farming. Athens 30-31 May 2003.
- Drake, P.; A. M. Arias, y A. Rodríguez. 1984. Cultivo extensivo de peces marinos en los esteros de las salinas de San Fernando (Cádiz): II. Características de la producción de peces. *Inf. Tec. Inst. Inv. Pesq*: 116, 1-23.
- Engrola, S.; L. E. C. Conceição; L. Dias; R. Pereira; L. Ribeiro y M. T. Dinis. 2007. Improving weaning strategies for Senegalese sole: effects of body weight and digestive capacity. *Aquaculture Res.*, 38: 696-707.
- Essed, Z., I. Fernández, F. J. Alarcón y F. J. Moyano. 2002. Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). En: VIII Congreso nacional de acuicultura: Acuicultura y desarrollo sostenible (22-25 de mayo, 2001. Santander, Cantabria, España). I. Arnal Atarés, C. Fernández-Pato, C. Martínez-Tapia y C. Mosquera de Arancibia (eds.). *Boletín. Instituto Español de Oceanografía* 18 (1-4): 99-107.
- FAO. 2010. Departamento de Pesca y Acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma, 2010. 242 pp.

- Fernández-Díaz, C.; M. Yúfera; J. P. Cañavate; F. J. Moyano; J. F. Alarcón y M. Díaz. 2001. Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *J. Fish Biol.* 58: 1086-1097.
- Flos, R.; L. Reig; J. V. Fernandez; P. P. Ambrosio y R. Carbo. 1995. Ensayos preliminares para el cultivo intensivo de lenguado. In: Castello i Orvay, F., Calderer i Reig, A. (Eds). Proceedings of the V Congreso Nacional de Acuicultura. Barcelona, España, pp. 839-844.
- García de la Banda, I., C. Lobo; J.M. León-Rubio; S. Tapia-Paniagua; M.C. Balebona; M.A. Moriñigo; X. Moreno-Ventas; L.M. Lucas; F. Linares; F. Arce y S. Arijo. 2010. Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, 306: 281-288.
- García de la Banda, I., C. Lobo, M. Chabrilón, J. M. León-Rubio, S. Arijo, G. Pazos, L.M. Lucas, M.A. Moriñigo. 2011. Influence of dietary administration of a probiotic strain *Shewanella putrefaciens* on Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) growth, body composition and resistance to *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*. *Aquac Res*, DOI: 10.1111/j.1365-2109.2011.02871.x.
- García-Millán, I., J.M. León-Rubio, P. Rosas-Ledesma, S. T. Tapia-Paniagua y S. Arijo. 2009. Detection of *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* proteins involved in the specific immune response of sole (*Solea senegalensis*) and cross reactivity with probiotics. In 14th International Conference of European Association of Fish Pathologists, Prague (Czech Republic).
- Gatesoupe F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180:147-165.
- Gómez, G. D. y J. L. Balcázar. 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 52, 145-154.
- Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber, y T. F. Nielsen. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 969-973.
- Imsland, A.K.; A. Foss; L. E. C. Conceição; M. T. Dinis; D. Delbare; E. Schram; A. Kamstra; P. Rema y P. White. 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Rev. Fish Biol. Fish.* 13, 379-407.

- Kubota A, F. He, M. Kawase *et al.* 2009. *Lactobacillus* strains stabilize intestinal microbiota in Japanese cedar pollionis patients. *Microbiol Immunol* 53:198-205.
- Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology* 20, 137-151.
- Maita, M., K.Satoh, S. Satoh, V. Kiron, T. Watanabe. 2002. Effects of non-fish meal diet on hematological parameters, disease resistance and lipid profiles of liver and erythrocytes in yellow tail. *World Aquaculture Society Book of Abstracts*, 475.
- Makridis, P., S. Martins, T. Vercauteren, K.V. Driessche, O. Decamp, y M.T. Dinis. 2005. Evaluation of candidate probiotic strains for gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*) using an in vivo approach. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 274-277.
- Martín-Antonio B, M. Manchado, C. Infante *et al.* 2007. Intestines microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes. *Aquac Res* 38:1213-1222.
- Mandal, S., A.K. Puniya, K. Singh. 2006. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16: 1190-1195.
- Merrifield, D.L., A. Dimitroglou, A. Foey *et al.* 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 320:1-18
- Moriñigo MA, V. Sánchez, T.F. Martínez *et al.* 2008. Encapsulation of a bacterial fish probiotic in alginate beads: protective effect under in vitro simulations of fish gastric conditions. In: Abstracts of the International Conference on Fish Diseases and Fish Immunology. University of Iceland, Reykjavik 6-9 September
- Nayak, S.K. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29: 2-14.
- Neumann, N. F., J. L. Stafford, D. Barreda, , A. J. Ainsworth y M. Belosevic. 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Development & Comparative Immunology* 25, 807-825.
- Olmedo, M.; J. B. Peleteiro; R. Cal y F. Linares. 2003. Crecimiento de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) en Galicia. En: *Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura*. Junta de Andalucía. Mayo 2003, Cádiz, pp. 383-385.

- Olsen, R. E., R. Myklebust, E. Ringo, y T. M. Mayhew. 2000. The influences of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. *Fish Physiology and Biochemistry* 22, 207-216.
- Padrós F.; C. Zarza; A. Estévez; S. Crespo y M. D. Furones. 2003. Patología como factor limitante para el desarrollo del cultivo del lenguado. En: *Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura*. Junta de Andalucía. May 2003, Cádiz, pp 343-345.
- Panigrahi, A., V. Kiron, S. Satoh *et al.* 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Dev Comp Immunol* 31:372–382.
- Panigrahi, A., V. Kiron, S. Satoh, T. Watanabe. 2010. Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Physiology and Biochemistry* 36: 969–977.
- Pfeiderer, G. 1970. Particle bound peptidase from pig kidney. *Methods in Enzymology* 19: 514-521
- Ribeiro, L.; C. Sarasquete y M. T. Dinis. 1999. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture*, 171: 293-308.
- Ribeiro, L.; S. Engrola y M. T. Dinis. 2005. Weaning of senegalense sole (*Solea senegalensis*) postlarvae to an inert diet with a co-feeding regime. *Cien. Mar.* 31: 327-337.
- Ringo, E., L. Lovmo, M. Kristiansen, Y. Bakken, I. Salinas, R. Myklebust, R.E. Olsen, y T.M. Mayhew. 2010. Lactic acid bacteria vs pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture Research* 41, 451-467.
- Rodríguez, J.P.; C. Perdigón *et al.* 1995. Estrategias de cultivo de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858) en estanques de la bahía de Cádiz. Datos preliminares. In: *Actas V Congreso Nacional de Acuicultura*. Sant Carles de la Ràpita, 10-13 May. Universitat de Barcelona, Barcelona, pp. 874-878.
- Rodríguez, J. L. y B. F. Souto. 2003. Engorde del lenguado senegalés (*Solea senegalensis* KAUP, 1858) en Galicia con temperatura controlada. En: *Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura*. Junta de Andalucía. Mayo 2003, Cádiz, pp 407-409.

- Rosas-Ledesma P., J.M. León-Rubio, F. J. Alarcón, M. A. Moriñigo y M. C. Balebona. 2011. Calcium alginate capsules for oral administration of fish probiotic bacteria: assessment of optimal conditions for encapsulation. *Aquaculture Research*, 2011, 1-11.
- Rueda-Jaso, R., L.E.C. Conceição, J. Dias, W. De Coen, E. Gomes, J.F. Rees, F. Soares, M.T. Dinis, P. Sorgeloos. 2004. Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture*, 231 417-433.
- Saénz de Rodrigáñez, M.; F. J. Alarcón; M. I. Martínez; F. Ruíz, M. Díaz y F. J. Moyano. 2005. Caracterización de las proteasas digestivas del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21 (1-4). 2005: 95-104.
- Saénz de Rodrigáñez, M.; C. de Oña; F. J. Alarcón; M. I. Martínez; M. Díaz y F. J. Moyano. 2005. Crecimientos y enzimas digestivas de larvas de *Solea senegalensis* Kaup, 1858 alimentadas con piensos comerciales. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21 (1-4). 2005: 105-113.
- Saénz de Rodrigáñez, M.A., P. Díaz-Rosales, M. Chabrilón, H. Smidt, S. Arijo, J.M. León-Rubio, F.J. Alarcón, M.C. Balebona, M.A. Moriñigo, J.B. Cara, F.J. Moyano. 2009. Effect of dietary administration of probiotics on growth and digestive tract of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition*, 15: 177-185.
- Salinas, I., P. Díaz-Rosales, A. Cuesta *et al.* 2006. Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Vet Immunol Immunopathol* 111:279-286.
- Satomi M, B.F. Vogel, L. Gram, K. Venkateswaran. 2006. *Shewanella putrefaciens* sp nov and *Shewanella morhuae* sp nov, isolated from marine fish of the Baltic Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:243-249.
- Sealey WM, F.T. Barrows, K.A. Johansen *et al* 2007. Evaluation of the ability of partially autolyzed yeast and gnotobiotic-A to improve disease resistance in rainbow trout. *North Amer J Aquacult* 69: 400-406.
- Silva, C.M., A.J. Ribeiro, M. Figueiredo, D. Ferreira y F. Veiga. 2006. Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *The AAPS Journal*, 7 (4) article 88.



- Sirvas-Cornejo, S., J.W. Latchford, y D.A. Jones. 2007. Effect of microencapsulated diets supplemented with genetically modified bacteria on the growth and survival of *Fenneropenaeus indicus* postlarvae. *Aquaculture Nutrition*, 13; 10–16
- Sugita, H., R.Okano, Y. Suzuki, D. Iwai, M. Mizukami, N. Akiyama y S. Matsuura. 2002. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fisheries Science* 68, 1004-1011.
- Tapia-Paniagua ST, M. Chabrión, P. Díaz-Rosales *et al.* 2010. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup 1858) following probiotic administration. *Microb Ecol* 60:310-319.
- Taoka, Y., H. Maeda, J.Y. Jo, S.M Kim, S. Park, T. Yoshikawa *et al.* 2006. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisher Sci.*, 72: 755-66.
- Toranzo A. E.; R. Abendaño; C. López-Vázquez; B. Magariños; C. P. Dopazo; J. L. Romalde y J. L. Barja. 2003. Principales patologías bacterianas y víricas en lenguado cultivado: caracterización y agentes etiológicos. En: *Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura*. Junta de Andalucía. Mayo 2003, Cádiz, pp 355.
- Varela, J.L.; I. Ruiz-Jarabo, L. Vargas-Chacoff, S. Arijo, León-Rubio, I. García-Millán, M.P. Martín del Río, M.A. Moriñigo, J.M. Mancera. 2010. Dietary administration of probiotic Pdp 11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. *Aquaculture*, 309: 265-271.
- Vendrell D, J.L. Balcázar, I. de Blas *et al.* 2008. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comp Immunol Microb* 31:337–345.
- Verschuere L, G. Rombaut, P. Sorgeloos, W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64: 655-671.
- Vine NG, W.D. Leukes, H. Kaiser. 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev* 30: 404-427.
- Vogel BF, K. Venkateswaran, M. Satomi, L. Gram. 2005. Identification of *Shewanella baltica* as the most important H<sub>2</sub>S-producing species during iced storage of Danish marine fish. *Appl Environ Microbiol* 71:6689-6697.

- Walter, H. E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substartes. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. H. J. Bergmeyer (ed.) 5: 270-277. Verlag Chemie. Weinham, Alemania.
- Wang Y-B, Z-Q. Tian, J-T. Yao, W-E. Li. 2008. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture* 277: 203-207.
- Watts, M., B. Munday y C. M. Burke, 2001. Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal* 79, 570-574.
- Wu S, T. Gao, Y. Zheng *et al.* 2010. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture* 303:1-7.
- Zambonino-Infante, J. L. y C. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 130: 477-487.
- Zorrilla, I., S. Arijo, M. Chabrillón, P. Díaz, E. Martínez-Manzanares, M.C. Balebona y M.A. Moriñigo. 2003. *Vibrio* species isolated from diseased farm sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potencial virulence role of their extracellular products. *J.Fish Dis.*, 26: 103-108.