

TESIS DOCTORAL

**Efecto de la adición de dos probióticos
(*Shewanella putrefaciens* y *Shewanella baltica*)
en el engorde del lenguado senegalés
(*Solea senegalensis* Kaup, 1858)**

Inés García de la Banda García



Enero 2011





**INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

Los Drs. D. Antonio J. Laborda Navia y D. Salvador Arijó Andrade como Directores¹ de la Tesis Doctoral titulada “**Efecto de la adición de dos bacterias probióticas (*Shewanella putrefaciens* y *Shewanella baltica*) en el cultivo de lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858)**” realizada por D. Inés García de la Banda en el Departamento de Biodiversidad y Gestión Ambiental, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 14 de enero de 2011

Fdo.: Antonio J. Laborda

Fdo.: Salvador Arijó

¹ Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.

“Fue el asombro, la distancia, el no querer dar por hecho nada de lo que observábamos, lo que originó, decían los griegos, la filosofía, o sea, la curiosidad, el apego, la necesidad y la pasión por entender y entendernos”

(Emilio Lledó)

AGRADECIMIENTOS

Es el momento de concluir esta tesis y me doy cuenta de todos los que desde diferentes lugares me han apoyado para llegar hasta aquí.

En primer lugar quiero agradecer a la tierra de León y a su Universidad, por acoger esta tesis. Es una tierra muy querida y muy visitada por mí y significa mucho presentar aquí mi trabajo.

A Antonio José Laborda, mi Director de Tesis leonés, por toda la confianza, interés y buen humor a lo largo del proceso. De verdad ha sido estupendo. Gracias.

En segundo lugar, me siento muy agradecida a la tierra de Andalucía por este enlace Norte-Sur que hemos establecido y ojalá siga dando buenos frutos.

A Salvador Arijó, mi Director de Tesis malagueño. Muchas gracias por la libertad que he disfrutado a lo largo de este trabajo. La discusión al final del trabajo ha sido muy interesante.

A Pedro Cañavate (El Toruño, Cádiz) por haberme sugerido continuar mi pasión con los probióticos, esta vez con el lenguado. También por todo lo aprendido de esta especie desde entonces y por haberme puesto en contacto con Miguel Angel Moriñigo y el Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, hace ya más de cinco años. Gracias, Pedro.

A Miguel Angel Moriñigo. Ha sido un viaje donde ha habido entendimiento y colaboración desde el principio y eso no es fácil de encontrar. Siempre he sentido un gran respaldo y no hemos parado de hacernos preguntas acerca de nuestros amigos los probióticos y su relación con los lenguados. Gracias también a tus colegas (M^a Carmen y Eduardo) y a todos los que me han echado un cable para llegar hasta aquí, sobre todo a Juanma y a Silvana. Y por supuesto a Mariana, la madre del Pdp11 y Pdp13.

A Juan Miguel Mancera, de la Universidad de Cádiz. Gracias por el entusiasmo con el que te has sumado al proyecto.

En tercer lugar a mi tierra, Cantabria y a todos los que desde allí y día a día han contribuido a que este estudio se haya hecho realidad.

Comienzo por mis colegas del Instituto Español de Oceanografía de Santander, investigadores, técnicos, ayudantes, personal de la administración. Asimismo al personal de apoyo técnico, mantenimiento, vigilancia nocturna, telefonía etc. Son muchos los compañeros que durante estos años han colaborado en el mantenimiento de los peces, midiendo y pesando, extrayendo muestras, controlando las bombas de entrada de agua, la aireación, etc. Sois muchos para nombraros a todos. Gracias, de verdad. Un recuerdo especial a Javi y las dos Mares.

Quiero dar un enorme agradecimiento a Carmen Lobo, con la que estoy encantada de trabajar y realmente me siento en equipo. A pie de tanque, frente a unos resultados diferentes a lo esperado, cuando hay que echar más horas de las calculadas,

siempre he podido contar con ella, con su capacidad y dedicación. Es una suerte. Gracias, Carmen.

También a Pablo Abaunza, actual Director del C.O. de Santander, a Eladio Santaella del C.O. de Madrid y a Enrique Tortosa, que fue Director General del Instituto Español de Oceanografía, por la ayuda y el respaldo recibidos en estos años para poder finalizar esta tesis.

En mi tierruca vaya además mi agradecimiento a los colegas del Departamento de Ciencias y Tecnología del Agua y del Medio Ambiente de la Universidad de Cantabria. Gracias a María Lucas y Jose Ramón Mira por la colaboración en las infecciones experimentales. A Xabier Moreno-Ventas con el tratamiento de datos. A Juan Carlos Cantera por posibilitarlo.

A Félix Arce, del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, por el interés que desde el principio ha puesto en el tema y los buenos ratos que nos ha deparado. Gracias a Montse Nicolás por las preparaciones histológicas.

A Esperanza Sola, del Servicio de Laboratorio y Control de la Consejería de Agricultura y Pesca de la C.A. de Cantabria, por la disponibilidad para colaborar cuando se le solicita algo “para ayer”.

También mi agradecimiento a Covadonga Rodríguez (Universidad de La Laguna) por su ayuda.

En el último trayecto de este viaje he tenido la suerte de contar con Marta Moyano, mi hija, que me ha ayudado enormemente con la edición y miles de problemas de última hora. Su cariño, compromiso, paciencia y eficacia han contribuido a finalizar este trabajo. Gracias, Martuca.

A mi familia de origen un recuerdo por las cosas buenas aprendidas.

A mi familia de Santander, que han vivido este viaje ilusionados y me han ayudado a digerir gran parte de los problemas que surgían en su desarrollo, gracias por el apoyo recibido. Especial mención a Pilar e Isabel. Su cariño, paciencia y comprensión han ido paralelos a unas excelentes comidas a lo largo del proyecto.

Finalmente, a Pilar García Merayo, presidenta de JONICA (Asociación para el Desarrollo de Corrientes Alternativas Vitales), fuente de inspiración profesional. Me ha enseñado a mirar a las cosas desde el vínculo, no instalándome en lo ya conocido y dando lugar a nuevas hipótesis de trabajo. Gracias, esta tesis te debe mucho.

FINANCIACIÓN PUBLICACIONES

La realización del presente trabajo ha sido financiada por los siguientes proyectos de investigación:

- “Análisis y estudio de factores de cultivo que condicionan la producción industrial del lenguado senegalés *Solea senegalensis*”. Plan Nacional para el cultivo del lenguado 2006-2008. Financiado por la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR)
- “Bases para el control de la reproducción y conocimiento del sistema de defensas naturales en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*)”. Plan Nacional para el cultivo del lenguado 2006-2008. Financiado por la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR)

Algunos fragmentos del presente trabajo han sido publicados en los siguientes medios:

Artículos científicos

- García de La Banda, I., Lobo, C., León-Rubio, J.M., Tapia-Paniagua, S.T., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Moreno-Ventas, X., Lucas, L.M., Linares, F., Arce, F., y Arijo, S. (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
- Tapia-Paniagua, S.T., Chabrillón, M., Díaz-Rosales, P. García de la Banda, I., Lobo, C., Balebona, M.C. y Moriñigo, M.A. (2010). Intestinal Microbiota Diversity of the Flat Fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) Following Probiotic Administration. *Microbial Ecology* 60: 310-319.
- García de La Banda, I., Lobo, C., Chabrillón, M., León-Rubio, J.M., Arijo, S., Pazos, G., Lucas, L.M., y Moriñigo, M.A.. 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. *Aquaculture Research* (en revisión).
- Tapia-Paniagua, S., Díaz-Rosales, P., León-Rubio, J.M., García de la Banda, I., Lobo, C., Alarcón, F.J., Chabrillón, M., Rosas-Ledesma, P., Varela, J.L., Ruiz-Jarabo, I., Arijo, S., Esteban, M.A., Martínez-Manzanares, E., Mancera, J.M., Balebona, M.C. y Moriñigo, M.A. Use of the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on the culture of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture International*. (en revisión).

Contribuciones a congresos

- García de La Banda, I., Lobo, C., Moriñigo, M.A., Chabrilón, M., León-Rubio, J.M., Arijo, S., Linares, F., Pazos, G. y Moreno-Ventas X. (2006) Effect of probiotic Pdp11 on ongrowing of Senegal sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). Congreso Europeo de Acuicultura.Florenia (Italia)
- García de La Banda, I., Lobo, C., Moriñigo, M.A., Chabrilón, M., León-Rubio, J.M., Arijo, S., Balebona, M.C., Pazos, G., Moreno, X., Lucas, M.L. y Arce, F. (2007). Influence of liophylized Pdp11 and Pdp13 probiotics on ongrowing of Senegal sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). Congreso Europeo de Acuicultura Estambul (Turquía).
- Martínez-Manzanares, E., Tapia-Paniagua, S.T., Balebona, M.C. García de la Banda, I., Lobo, C. y Moriñigo, M.A. (2008). Influence of probiotic microorganisms on the microbiota of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) specimens. IV Workshop de lenguado. Faro (Portugal).
- García de la Banda, I., Lobo, C., León-Rubio, J.M., Tapia-Paniagua, S.T., Moriñigo, M.A., García-Millán, I., Arijo., S., Arce, F., Nicolás, M., Pazos, G. y Moreno-Ventas, X. (2009). Administración de dos probióticos relacionados (Pdp11 y Pdp13) en preengorde de lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup 1858). Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid, España
- Tapia-Paniagua, S.T, García de la Banda, I., Lobo, C., Chabrilón, M., Rico, R., León-Rubio, J.M. y Moriñigo, M.A. (2009). Effect of dietary administration of probiotics on intestinal microbiota of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). Congreso Europeo de Acuicultura. Trondheim (Noruega).
- García de La Banda, I., Lobo, C., Lucas, M.L., Tapia-Paniagua S.T., Ruiz-Jarabo I., León-Rubio J.M., Mancera J.M., Moriñigo M.A., Arijo S. y Moreno-Ventas X. (2010). Influence of different ways of administration (fresh and liophylized) of Pdp11 *Shewanella putrefaciens* on growth and performance of sole juveniles (*Solea senegalensis*, KAUP, 1858). Congreso Europeo de Acuicultura. Oporto (Portugal).
- Tapia-Paniagua S.T., Diaz-Rosales P., León-Rubio J.M., García de la Banda I., Lobo C., Alarcón F.J., Chabrilón M., Mancera J.M., Varela J.L., Ruiz-Jarabo I., Arijo S., Martinez-Manzanares E., Balebona M.C. y Moriñigo M.A. (2010). Different effects of the use of the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on the culture of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). Congreso de Fisiología de Peces. Barcelona (España).

RESUMEN

El conocimiento, prevención y tratamiento de las patologías existentes es posiblemente el factor más limitante en la actualidad para el engorde del lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). Los actuales sistemas de producción intensiva suponen un estrés para los ejemplares en cultivo, ocasionando una menor eficiencia digestiva, una mayor susceptibilidad frente a patógenos potenciales y pérdidas económicas para la industria. Puesto que la producción en acuicultura depende, en buena medida, del “status” fisiológico de los peces, se hace preciso el empleo de piensos comerciales específicos y adecuados protocolos de cultivo que favorezcan el bienestar animal. La utilización de probióticos a nivel comercial en dieta es ya una herramienta eficaz para la mejora del metabolismo, reducción de deformidades y prevención de patologías en acuicultura. Por el momento no son bien conocidos sus mecanismos de actuación, pero crece el número de investigaciones que aconsejan su incorporación a dietas para acuicultura. El objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de la adición en dieta de dos cepas (Pdp11 y Pdp13), seleccionadas por sus características “in vitro”, como probióticos potenciales, en el engorde de *S. senegalensis*.

La adición de los probióticos Pdp11 y Pdp13 en dieta produjo una modulación de la microbiota intestinal de los juveniles de *S. senegalensis*, no necesariamente asociada a la colonización de las cepas en el intestino. Este efecto es más intenso en los ejemplares alimentados con Pdp13, que sin embargo presentaron una menor riqueza específica. Así mismo la modulación es mayor cuando Pdp11 se administra liofilizado en lugar de fresco. La incorporación de ambas cepas en la dieta protegió a los especímenes frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, patógeno de gran virulencia para esta especie. El porcentaje de supervivencia relativa promovido por los probióticos disminuyó en relación inversa a la calidad del pienso utilizado, manifestándose ya a los 15 días del inicio de la administración probiótica. Sin embargo, la adición del probiótico no pareció afectar especialmente a la respuesta inmunitaria estudiada, detectándose únicamente un aumento significativo de los niveles de actividad antiproteasa en los ejemplares alimentados con Pdp13 fresca.

A pesar de que las cepas probióticas Pdp11 y Pdp13 están muy próximas taxonómicamente, presentan diferencias en sus actividades metabólicas, en el nivel de lípidos totales y perfil de ácidos grasos, así como en las actividades de inhibición “in vitro” de los patógenos *P. damsela* subsp. *piscicida* y *Vibrio harveyi*. Además Pdp11 y Pdp13 promovieron diferencias en el crecimiento, la composición corporal, la histología de digestivo e hígado, la modulación de la microbiota digestiva y la respuesta inmunitaria en juveniles de *S. senegalensis* en el engorde. Estos resultados sirvieron para preseleccionar a Pdp11 para una futura utilización industrial.

La implementación de Pdp11 en una dieta comercial de alto contenido lipídico promovió una mejor condición del digestivo e hígado en ejemplares de *S. senegalensis* en engorde. Asimismo su adición mejoró los niveles de metabolitos en el plasma,

hígado y músculo de los peces, siendo mayor la intensidad cuando Pdp11 fue administrado en fresco. Destaca el mayor nivel de glucógeno detectado en el hígado de los ejemplares, relacionado con una mayor reserva energética, lo que mejoraría la respuesta frente a un posible estrés.

El hecho de que el probiótico liofilizado, a pesar de su casi nula viabilidad, tenga un efecto sobre el pez, denota que éste no necesariamente se corresponde con un proceso de colonización del intestino o una interacción como microorganismo vivo y activo. Parece más bien condicionado por la existencia de enzimas, nutrientes que complementan la dieta del pez, sustancias inmunoestimulantes que actual localmente o bien la presencia de sustancias antimicrobianas.

Se necesitan futuros trabajos para comprender el mecanismo de relación entre Pdp11 y su huésped, lo que ayudará a determinar los factores específicos relacionados con las mejoras observadas.

	Página
INTRODUCCIÓN	
1. Situación actual de la acuicultura	
1.1. La acuicultura como alternativa	18
1.2. La acuicultura europea	21
1.3. La acuicultura en España	23
2. El cultivo del lenguado senegalés	
2.1. Características del lenguado senegalés	25
2.2. Antecedentes del cultivo del lenguado senegalés	26
2.3. Avances en la investigación de la investigación del lenguado Senegalés	30
3. Factores limitantes del engorde de lenguado senegalés	
3.1. Patologías en el lenguado senegalés	32
3.2. Utilización de piensos comerciales no específicos	34
4. Mejoras en la etapa de engorde	
4.1. Prevención y tratamiento de patologías en el lenguado senegalés	39
4.2. Desarrollo de dietas específicas	41
4.3. Apoyo de las defensas naturales	44
5. Probióticos en acuicultura	
5.1. Probióticos, características y modos de actuación	46
5.2. Probióticos ensayados en acuicultura	48
5.3. Probióticos en lenguado senegalés	53
OBJETIVOS	59
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Microorganismos empleados	63
1.1. Capacidad inhibitoria de los probióticos Pdp11 y Pdp13	64
1.2. Obtención de proteínas extracelulares (ECPs) de los probióticos Pdp11 y Pdp13	65
2. Peces y dietas experimentales	
2.1. Condiciones de cultivo de los peces y dietas experimentales	65
2.2. Preparación de dietas experimentales	
2.2.1. Incorporación del probiótico fresco en pienso y posterior peletización	65
2.2.2. Incorporación del probiótico fresco o liofilizado en el pienso ya peletizado	67
2.3. Viabilidad de los probióticos incluidos en el pienso	67
3. Infecciones experimentales	68

	Página
4. Análisis bioquímicos en probióticos, pienso, hígado y músculo de ejemplares	68
4.1. Medida de proteínas	69
4.2. Medida de lípidos totales	69
4.3. Análisis de ácidos grasos	70
5. Análisis histológicos	
5.1. Fijación e inclusión en parafina	70
5.2. Obtención de las secciones	70
5.3. Tinción con hematoxilina-eosina y PAS	71
5.4. Montaje y observación al microscopio	72
6. Análisis inmunológicos	
6.1. Obtención de suero	72
6.2. Obtención de bacterina de <i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>piscicida</i>	73
6.3. Obtención de proteínas de la membrana externa (OMPs) de los probióticos Pdp11 y Pdp13	73
6.4. Determinación del patrón de proteínas de las fracciones celulares (ECPs y OMPs) de los probióticos Pdp11 y Pdp13 mediante electroforesis	74
6.5. Determinación de proteínas inmunogénicas mediante Western-Blot	75
6.6. Titulación de anticuerpos específicos	76
6.7. Determinación de la actividad lisozima	77
6.8. Determinación de la actividad antiproteasa	78
7. Microbiota digestiva	
7.1. Extracción del DNA intestinal	78
7.2. Amplificación de los genes 16S rDNA y análisis de los productos PCR por electroforesis en gradiente de gel desnaturizante (DGGE)	79
7.3. Análisis de los patrones de DGGE	79
8. Análisis de metabolitos	
8.1. Toma de muestras	80
8.2. Homogeneización	81
8.3. Determinación de glucosa	81
8.4. Determinación de lactato	82
8.5. Determinación de proteínas totales	82
8.6. Determinación de triglicéridos	83
8.7. Determinación de aminoácidos libres totales	83
8.8. Determinación de glucógeno	84
9. Análisis estadísticos	84
10. Diseño experimental	
10.1. Ensayo PROBIO 1.	85
10.2. Ensayo PROBIO 2	86
10.3. Ensayo PROBIO 3	87
10.4. Ensayo PROBIO 4	88

	Página
RESULTADOS	
1. PROBIO1. Influencia del probiótico <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 fresco en el crecimiento, composición corporal y resistencia frente a <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en lenguado (<i>Solea senegalensis</i>) durante el engorde	
1.1. Resistencia frente a infección experimental (IP) con <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	93
1.2. Crecimiento de los ejemplares en cultivo	94
1.3. Composición corporal de los ejemplares al término de la experiencia	94
1.4. Viabilidad bacteriana en pienso	96
2. PROBIO2. Efecto de la administración de <i>Shewanella</i> Pdp11 y Pdp13 liofilizadas, en el desarrollo y resistencia frente a <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en juveniles de lenguado (<i>Solea senegalensis</i>)	
2.1. Resistencia frente a la infección experimental (ip) con <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	97
2.2. Crecimiento de los ejemplares en cultivo	97
2.3. Composición corporal de los ejemplares al término de la experiencia	98
2.4. Histología de músculo, hígado e intestino de ejemplares al término de la experiencia	102
2.5. Estudio de la microbiota digestiva al término de la experiencia	104
2.6. Viabilidad bacteriana en pienso	105
3. PROBIO3. Adición de probióticos <i>Shewanella</i> Pdp11 y Pdp13 administrados frescos en preengorde de lenguado (<i>Solea senegalensis</i>)	
3.1. Características metabólicas de los probióticos ensayados	107
3.2. Capacidad inhibitoria “in vitro” de Pdp11 y Pdp13	108
3.3. Composición bioquímica de Pdp11 y Pdp13	109
3.4. Crecimiento de los ejemplares en cultivo	111
3.5. Estudio de parámetros inmunológicos al término de la experiencia	112
3.6. Evolución de la microbiota digestiva y modulación probiótica	113
3.7. Estudio histológico de digestivo, hígado y músculo	114
3.8. Composición corporal de los ejemplares al término de la experiencia	115
3.9. Viabilidad del probiótico en pienso	118
4. PROBIO4. Modulación del estado fisiológico e inmunológico de juveniles de lenguado (<i>Solea senegalensis</i>) alimentados con dietas adicionadas del probiótico <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 fresco y liofilizado durante el preengorde	
4.1. Resistencia frente a la infección experimental (ip) con <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	119
4.2. Estudio de parámetros inmunológicos al término de la experiencia	119
4.3. Crecimiento de los ejemplares en cultivo	123
4.4. Estudio de parámetros metabólicos al término de la experiencia	124
4.5. Evolución de la microbiota digestiva	125
4.6. Estudio histológico de hígado y músculo	126
4.7. Composición corporal de los ejemplares al término de la experiencia	127
4.7. Composición bioquímica (proteínas, lípidos y perfil de ácidos grasos) de las dietas utilizadas	127

	Página
4.6. Actividades enzimáticas en la cepa Pdp11	130
DISCUSIÓN	
1. Influencia de la alimentación con probióticos sobre el crecimiento de lenguado senegalés en engorde	133
2. Influencia de la alimentación con probióticos sobre la composición corporal de lenguado senegalés en engorde	135
3. Influencia de la alimentación con probióticos sobre la condición histológica de lenguado senegalés en engorde	140
4. Influencia de la alimentación con probióticos sobre parámetros metabólicos de lenguado senegalés en engorde	143
5. Influencia de la alimentación con probióticos sobre parámetros inmunológicos de lenguado senegalés en engorde	143
6. Estudio de la influencia de los probióticos sobre la microbiota intestinal de los peces	146
7. Efecto protector de los probióticos frente a infecciones experimentales con el patógeno <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	148
8. Optimización del método utilizado para la incorporación de los probióticos en los piensos y su posterior administración a los peces	151
9. Caracterización bioquímica y enzimática de las cepas utilizadas. Ensayos de inhibición “in vitro frente a patógenos	151
10. Resumen general sobre la influencia de la alimentación con los probióticos Pdp11 y Pdp13 sobre el crecimiento y salud de lenguado senegalés en engorde	153
CONCLUSIONES	159
BIBLIOGRAFÍA	163
ANEXOS	
Anexo I	203
Anexo II	205

INTRODUCCIÓN

1. Situación actual de la acuicultura

1.1. La acuicultura como alternativa

Los recursos marinos son vitales dada la creciente demanda mundial de proteína animal, derivada del aumento demográfico (8 mil millones de seres humanos para 2030) y de los hábitos dietéticos actuales, que relacionan la salud y el consumo de pescado (FAO, 2002; 2003). El pescado es considerado un alimento fundamental en la dieta, ya que aporta proteínas de fácil digestión, ácidos grasos esenciales de la serie n-3 e importantes minerales y vitaminas, sobre todo A y D (Norum, 2004). Su consumo ayuda a un adecuado balance de ácidos grasos poliinsaturados n-3/n-6, relacionado con la expresión génica, previniendo de modo natural algunas de las actuales enfermedades crónicas o degenerativas (Simopoulos, 2006).

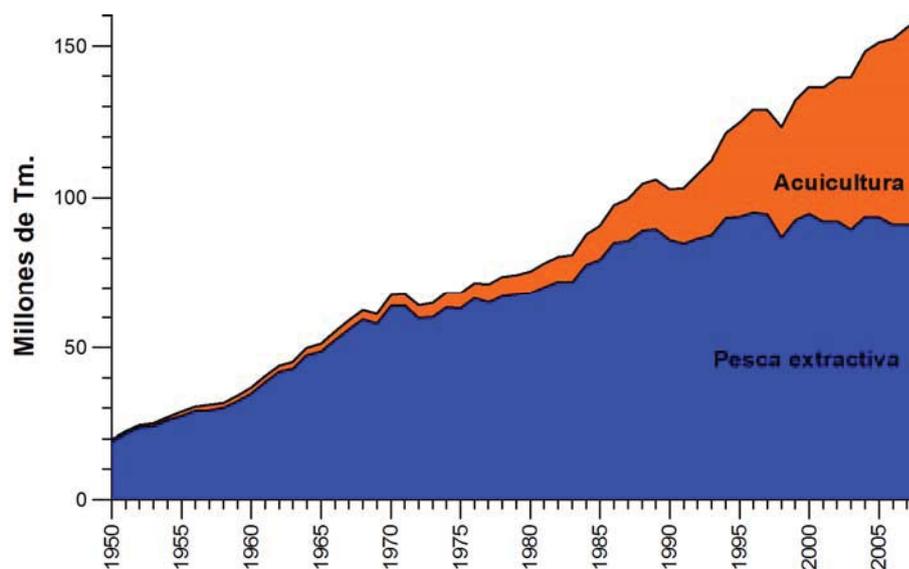


Figura 1. Evolución de la obtención de peces a nivel mundial entre 1950 y 2008, detallando la contribución de la pesca extractiva y de la acuicultura. (FAO 2010)

Es importante señalar que las cifras actuales del mercado mundial de pesca, tanto de especies capturadas como de crianza, son las mayores jamás registradas en la historia. Del total de la producción mundial en el año 2006, el 77% se utilizó para el consumo humano (Tabla 1), empleándose el resto para la fabricación de distintos productos, sobre todo harina y aceite de pescado (FAO, 2008). Sin embargo, es bien conocida la sobreexplotación de los caladeros y el estancamiento de las pescas extractivas que existe desde los años 80 como se puede observar en la Figura 1.

Esta situación se está haciendo cada vez más grave ya que, según la última valorización de la Agencia Global sobre stocks pesqueros (FAO, 2007a), de los casi 600 grupos de especies que se controlan y comercializan, sólo el 23 % son moderadamente explotados o están por debajo del nivel de explotación.

Tabla 1. Capturas pesqueras y producción en acuicultura mundial (en millones de toneladas) (FAO, 2008).

		2002	2003	2004	2005	2006
CONTINENTAL						
Producción	Captura	8,7	9,0	8,9	9,7	10,1
	Acuicultura	24,0	25,5	27,8	26,9	31,6
	Total continental	32,7	34,4	36,7	39,3	41,7
MARINA						
Producción	Captura	84,5	81,5	85,7	84,5	81,9
	Acuicultura	16,4	17,2	18,1	18,9	20,1
	Total marina	100,9	98,7	103,8	103,4	102,0
TOTAL CAPTURA		93,2	90,5	94,6	94,2	92,0
TOTAL ACUICULTURA		40,4	42,7	45,9	48,5	51,7
TOTAL PESCA MUNDIAL		133,6	133,2	140,5	142,7	143,6
Utilización	Consumo humano	100,7	103,4	104,5	107,1	110,4
	Usos no alimentarios	32,9	29,8	36,0	35,6	33,3
	Población (miles de millones)	6,3	6,4	6,4	6,5	6,6
	Suministro per cápita de pescado para consumo humano (kg)	16,0	16,3	16,2	16,4	16,7

La acuicultura ha sido considerada una actividad de interés por la FAO desde 1992 y se define como el cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas, que implica la intervención del hombre para mejorar la producción, así como la propiedad de lo que se está cultivando. En la figura 2 se muestra la producción acuícola mundial con los grupos cultivados más significativos (APROMAR, 2010).

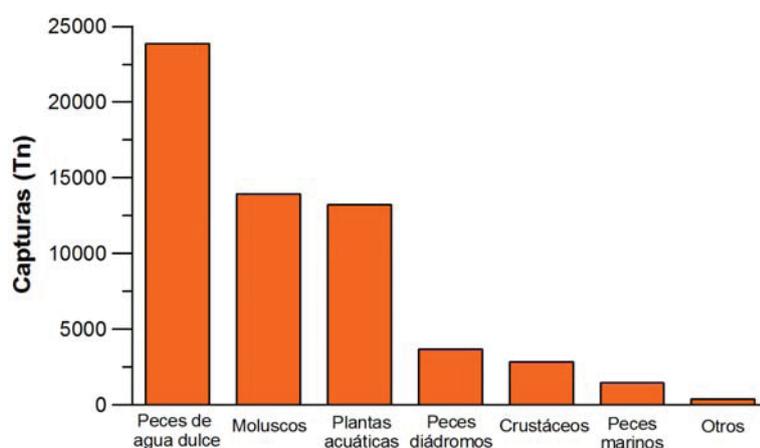


Figura 2. Producción de acuicultura mundial por volumen de los grupos más significativos (FAO, 2008).

Si bien en 1970 la producción derivada de la acuicultura alcanzaba sólo un 4% de la total acuícola mundial, el crecimiento experimentado en los últimos años la sitúa en un 48,1% del total en 2007 (FAO, 2010). Al auge de esta actividad ha contribuido el avance en las tecnologías de producción acuícola tales como el control sobre la reproducción de las especies, el mejor conocimiento de su biología y el desarrollo de dietas específicas. Actualmente está considerada como uno de los sectores productores de alimento con mayor potencial de crecimiento (8,9% anual) y va a desempeñar un papel esencial para el futuro de la alimentación humana.

El potencial de la acuicultura para la mejora del nivel de vida y el incremento de la seguridad alimentaria, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, ha sido reconocido en la Declaración y Estrategia de Bangkok (FAO, 2001). Así mismo se evidenció que un 50% del pescado consumido en todo el mundo era ya de crianza dentro del encuentro organizado en 2006 por el Subcomité del COFI (Comité de Pesca de la FAO) para evaluar el estado de la acuicultura en el mundo celebrado en Delhi (India). Todos los factores anteriormente mencionados hacen de la acuicultura una alternativa importante como respuesta a la demanda mundial de alimento y desarrollo (FAO, 2009).

1.2. La acuicultura europea

La acuicultura europea se caracteriza por el cultivo de especies de alto valor añadido mediante sistemas tecnológicamente avanzados. No obstante, sigue existiendo un fuerte componente de la acuicultura más tradicional, como ocurre en el caso de los cultivos de ostra y mejillón en Francia y España.

La producción de especies piscícolas frente a las capturas pesqueras es especialmente destacable en aquellas ampliamente comercializadas, como por ejemplo la dorada (Fig. 3)

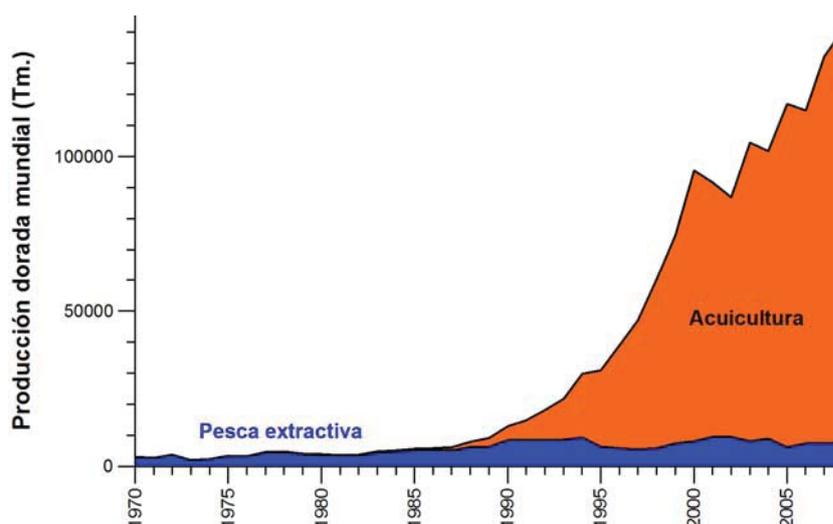


Figura 3. Producción de dorada de acuicultura y capturas pesqueras desde 1970 a 2008 (FAO 2010).

Los costes de la producción piscícola marina están ajustados: más del 40% son para la alimentación de los ejemplares, el 20% para la obtención de juveniles, 13% para pagar los salarios de los operarios, un 3% para el mantenimiento de las instalaciones, 7% para depreciación, etc. Además según el Informe de Acuicultura Mediterránea (FAO, 2010), no hay una gran diferencia entre los costes fijos de producción de los ejemplares cultivados en jaulas en el mar ó en cultivo intensivo en tierra. El incremento de la competitividad en la acuicultura de peces marinos en el área Mediterránea (60% más de juveniles entre 2003 y 2007) y la consecuente bajada de precios en el producto final han contribuido a la crisis del sector, agudizada desde 2009 por la crisis económica global.

A menudo el incremento en la producción viene acompañado de una bajada de precios en el mercado (Fig. 4) Sin embargo, las piscifactorías han continuado mejorando sus instalaciones y estableciendo protocolos de cultivo eficaces que aseguren un nivel de producción y calidad adecuados.

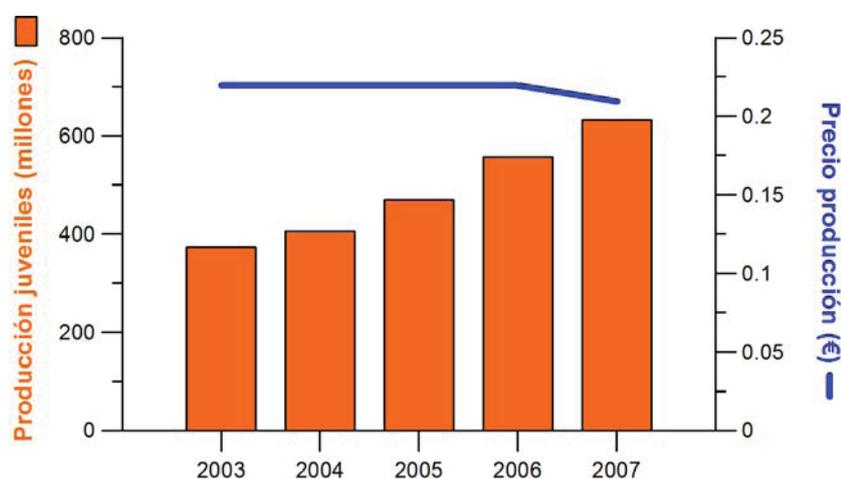


Figura 4. Evolución de la producción y precio de la dorada. Informe Acuicultura Mediterránea (FAO, 2010).

La FAO en su informe de 2002 señaló los principales factores que iban a limitar en el futuro el desarrollo de la acuicultura: la falta de inversión de capital de los productores, la escasez de espacio disponible, el elevado coste energético del combustible, el impacto medioambiental y el cuestionamiento del suministro futuro de harinas y aceites de pescado. Estas cuestiones siguen vigentes en la actualidad, aún habiéndose desarrollado estrategias a nivel mundial para su implementación en ésta última década. En concreto, la sustitución de las harinas de pescado por harinas de origen vegetal tales como la soja, el maíz, el guisante, las algas, continúa siendo una de las áreas prioritarias de investigación actuales. Asimismo, en algunas especies de peces es preciso aún optimizar diferentes fases de su cultivo: calidad de gametos, supervivencia larvaria, crecimiento de juveniles, susceptibilidad a enfermedades y calidad de la producción final.

La Comisión Europea viene impulsando en los últimos años investigaciones y tecnologías en infraestructuras y alimentos que contribuyan a aumentar la eficiencia de

la producción, reducir los costes económicos, minimizar los conflictos sociales con otros usos del medio, reducir los impactos medioambientales y mejorar el bienestar animal. Para conseguir estos objetivos de una forma coordinada entre sus países miembros se creó la Plataforma Europea de Innovación y Tecnología en Acuicultura (EATIP) en 2007.

Recientemente en la acuicultura europea fruto de estos nuevos objetivos ha tomado importancia la producción ecológica u orgánica, alcanzando el 0,1% de la producción marina total en el año 2007. Las estimaciones de la FAO en la Conferencia de Acuicultura Orgánica celebrada en Vietnam (2004) indicaron que se conseguirían 70.000 Ton de producción de acuicultura ecológica en 2010 y más de un millón de toneladas en 2030 (FAO, 2004). Sin embargo estas predicciones resultaron ser conservadoras, registrándose una producción de 60.000 Ton ya en 2007.

1.3. La acuicultura en España

España cuenta con más de 7.000 kilómetros de costa, lo que nos convierte en un país marítimo en nuestra economía e ictiófago en nuestra dieta. Somos también una potencia pesquera significativa, con una flota que representa el 20% de todos los barcos censados en la Unión Europea. Nuestro mercado pesquero es el tercero a nivel mundial, sólo detrás de Estados Unidos y Japón. Los últimos datos de consumo alimentario en España, procedentes del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Mercasa, 2010), indican que el consumo de productos pesqueros asciende a 37,5 Kg/hab/año. La tendencia al alza del mismo conlleva un incremento de las importaciones, que hoy representan un 30% del volumen total, y una diversificación y aumento en la producción de las especies de crianza.

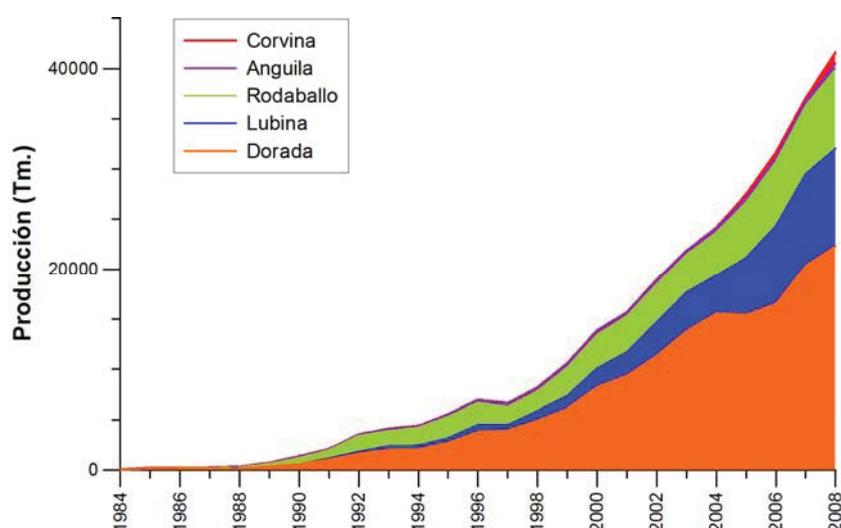
Hasta la década de los ochenta la producción acuícola española se concentraba en unas pocas especies repartidas en pequeñas empresas tradicionales de economía familiar, siendo tres los cultivos más característicos: mejillón en las rías gallegas, trucha arcoiris y acuicultura en los esteros gaditanos. A partir de entonces se inició el desarrollo de una piscicultura marina moderna, impulsada por una política de subvenciones de la UE. Durante los últimos veinte años, son ya más de treinta las especies de peces objetivo de estudio para su cultivo en el mediterráneo. En éste tiempo una fuerte evolución industrial en acuicultura, ha situado a nuestro país en el puesto 15 del ranking mundial de la producción acuícola, contribuyendo con un 25% a la producción europea y un 3% a la producción mundial. En la actualidad, existe una apuesta empresarial en nuestro país de optimizar la producción acuícola para conseguir un producto final de trazabilidad, adecuado para el consumo humano, y con un valor añadido de calidad que le diferencie del resto (De Blas Carbonero, 2005).

Entre las especies de peces de cultivo marino pioneras en España y ampliamente comercializadas en los últimos años, se encuentran la dorada (*Sparus aurata*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*) en el Mediterráneo y el rodaballo (*Psetta maxima*) en el Atlántico. La producción de algunas de estas especies se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Producción de acuicultura (toneladas) en España. Informe Acuicultura Mediterránea (FAO, 2010).

Año	Lubina	Dorada	Total
2003	4529	12442	16971
2004	4700	13034	17734
2005	5492	15577	21069
2005	8930	20220	29150
2007	10480	22320	32800

Sin embargo el estancamiento observado en la producción de peces marinos en Europa en los últimos años se ha visto reflejado también en nuestro país (Fig. 5).

**Figura 5.** Acuicultura marina de peces en España. Informe Acuicultura Mediterránea (FAO,2010) .

La saturación alcanzada en el mercado en dicha producción ha traído consigo la diversificación de especies acuícolas con el inicio del cultivo del besugo (*Pagellus bogaraveo*), el pargo (*Pagrus pagrus*), el abadejo (*Pollachius pollachius*), la corvina (*Argyrosomus regius*), el atún (*Thunnus thynnus*) y el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Esta especie ha sido tradicionalmente cultivada en esteros del sur de España y Portugal. Existen varios estudios relacionados con su acuicultura en el litoral gaditano y en estuarios portugueses de hace ya más de veinte años (Drake, *et al.*, 1984; Rodríguez, 1984; Dinis, 1986; Arias y Drake, 1990) que ayudaron a comprender mejor la biología del lenguado senegalés. El interés empresarial de entonces, centrado en la comercialización de las especies clásicas, junto con datos de bajo crecimiento para el lenguado común (*Solea solea*), retrasaron sin embargo el desarrollo del cultivo de ésta especie.

El lenguado senegalés es una especie apreciada en nuestro mercado, muy buena para la salud, dado su valor calórico moderado y su interesante aporte de ácidos grasos de la serie n-3. El lenguado de cultivo, de reciente presencia en el mercado, tiene buenas perspectivas (APROMAR, 2010), pues mantiene los niveles de ácidos grasos

poliinsaturados (PUFAs) de los ejemplares salvajes al contener un mayor nivel lipídico total. Son numerosas las referencias que relacionan el consumo de pescado con el control del colesterol, la prevención de enfermedades cardiovasculares (Gebauer *et al.*, 2006; Psota *et al.*, 2006; Simopoulos, 2006) y neurodegenerativas (Young y Conquer, 2005; Mazza *et al.*, 2006). Además esta especie ha estado frecuentemente asociada en nuestro país a dietas para la infancia ó recomendada en procesos de convalecencia.

2. El cultivo del lenguado senegalés

2.1. Características del lenguado senegalés

El lenguado senegalés (*S. senegalensis*, Kaup 1858) es un teleósteo marino perteneciente al Orden de los Pleuronectiformes y a la familia de los Soleidae, que está compuesta de 22 géneros y 90 especies (Nelson, 2006) (Fig. 6). Desde la primera descripción de Chabanaud (1927), ha sido citada su presencia desde Senegal a Bretaña, observándose también en el Mediterráneo Occidental hasta las costas de Túnez (Rodríguez, 1984). El lenguado senegalés es un pez plano, de cuerpo ovoide y asimétrico, con los ojos situados en la zona dorsal. Presenta además la aleta pectoral derecha redondeada y subsimétrica, con la membrana interr radial negra, rasgo éste que le diferencia del lenguado común (*S. solea*) (que sólo tiene una mancha negra en dicha aleta). Los últimos radios de las aletas dorsal y anal están unidos al pedúnculo caudal mediante una membrana, por lo que la aleta dorsal se inicia por delante del ojo. En todos los ejemplares de esta especie se detectan unas manchas marrón oscuro de mediano tamaño, dispuestas a lo largo de la línea media del cuerpo. La boca es pequeña, con forma semicircular y llega a alcanzar el borde del ojo derecho. El ejemplar adulto medio en condiciones naturales puede alcanzar una longitud entre 24 y 50cm y un peso entre 200g y 2Kg.



Figura 6. *S. senegalensis* en engorde.

El lenguado senegalés es una especie de hábitos bentónicos, que vive a profundidades no mayores de 100m, en fondos cubiertos de arena ó lodo, dejando al descubierto sólo los ojos. Emplea su olfato para seleccionar el alimento, compuesto preferentemente por poliquetos, anfípodos, copépodos e isópodos (Drake y Arias, 1989) y en menor porcentaje moluscos bivalvos y pequeños crustáceos (Abellán y Basurco, 1999; Cabral, 2000; Vieira *et al.*, 2003).

El lenguado senegalés alcanza la madurez sexual con 30-32 cm, presentando el desove tanto en primavera como en otoño (Rodríguez, 1984; Dinis *et al.*, 1999), siendo mayor la cuantía y la calidad de la puesta en primavera. Un parámetro desencadenante de dicho desove es la fluctuación térmica natural de primavera (15-22° C), y de otoño (22-15° C). Anguis y Cañavate (2005) observaron una clara correlación positiva entre las fluctuaciones periódicas de la temperatura del agua y la fecundidad relativa del lenguado senegalés mantenido en cautividad. Esta característica ha sido utilizada como estrategia para la inducción de la puesta en instalaciones acuícolas con capacidad técnica para regular cambios en la temperatura del agua.

La composición corporal del músculo en el lenguado senegalés adulto salvaje es de alrededor de un 73% en proteínas y de un 3-5% en lípidos totales, mientras que la respectiva de los ejemplares cultivados es de un 70-85% en proteínas y de un 5-12% en lípidos totales. (Hernández y García-García, 2004). Los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y saturados (SAFAs) son mayores en los ejemplares salvajes que en los cultivados (59,29%-35,16- vs 48,68%-28,30% respectivamente), siendo por el contrario, los valores de monoinsaturados (MUFAs) menores (12,42% vs 26,18%). Los contenidos en ácidos grasos de la serie n-3 son similares, pero los de la serie n-6 son superiores en los lenguados salvajes (26,70% vs 14,78%). Los niveles de lípidos y el perfil de ácidos grasos que presenta un determinado ejemplar de lenguado cultivado vendrá determinado fundamentalmente por el nivel lipídico de la dieta, que a su vez dependerá de las materias primas empleadas (Sargent *et al.*, 1999a; Borges *et al.*, 2009; Rodiles *et al.*, 2009a; Rodiles *et al.*, 2009b).

2.2. Antecedentes del cultivo de lenguado senegalés

El aumento de las investigaciones sobre el cultivo de esta especie presenta un paralelismo con el realizado sobre cultivos de peces en general, desde las 2-3 publicaciones anuales aportadas a mediados de los años 90, hasta las 20-25 en la actualidad (Fig. 7).

En España, el Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola (IFAPA) El Toruño (Cádiz), viene trabajando desde 1992 en la reproducción en cautividad del lenguado senegalés, obteniendo puestas que han permitido la investigación en diferentes centros y el inicio del cultivo en varias empresas de nuestro país. El desove en este centro, se produce de forma regular y natural en tanques sin sustrato arenoso, a partir de ejemplares salvajes cultivados en cautividad con agua natural de los caños de la bahía de Cádiz. Los reproductores se encuentran estabulados a densidades en torno a 1 ejemplar/m² y con proporciones de sexo (hembras:machos) de 1:1 a 1:2. En estas condiciones se han llegado a registrar puestas naturales en primavera y otoño, con una fecundidad media de alrededor de 28.000 huevos por puesta y kilo de ejemplar hembra, lo que supone hasta millón y medio de huevos al año por kilo de ejemplar hembra

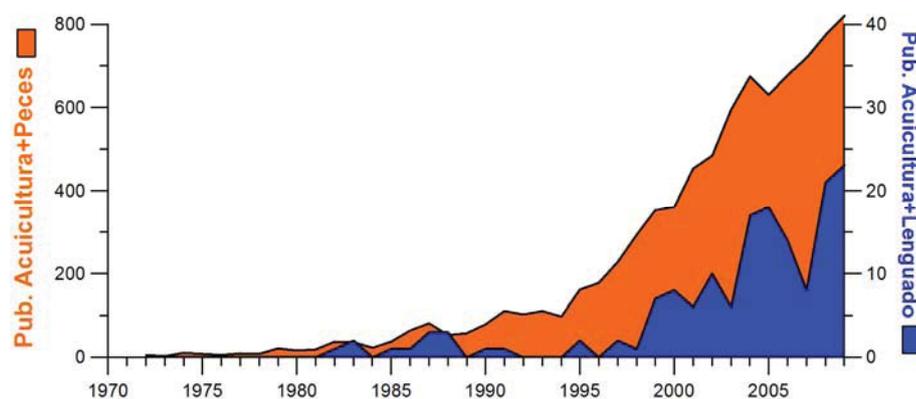


Figura 7. Evolución de publicaciones relacionadas con acuicultura de peces y de lenguado.

hembra. (Anguis y Cañavate, 2005). La correlación observada por estos autores entre las fluctuaciones periódicas de la temperatura del agua y la fecundidad relativa del lenguado senegalés han permitido transferir esta tecnología a otras instalaciones en diferentes partes de España. Sin embargo, en la actualidad la reproducción de los ejemplares nacidos en cautividad (generación F1) no está resuelta a nivel industrial. Por ello, la producción de huevos y alevines continúa condicionada a la captura periódica de ejemplares salvajes, para el mantenimiento adecuado del stock reproductor en cada instalación.

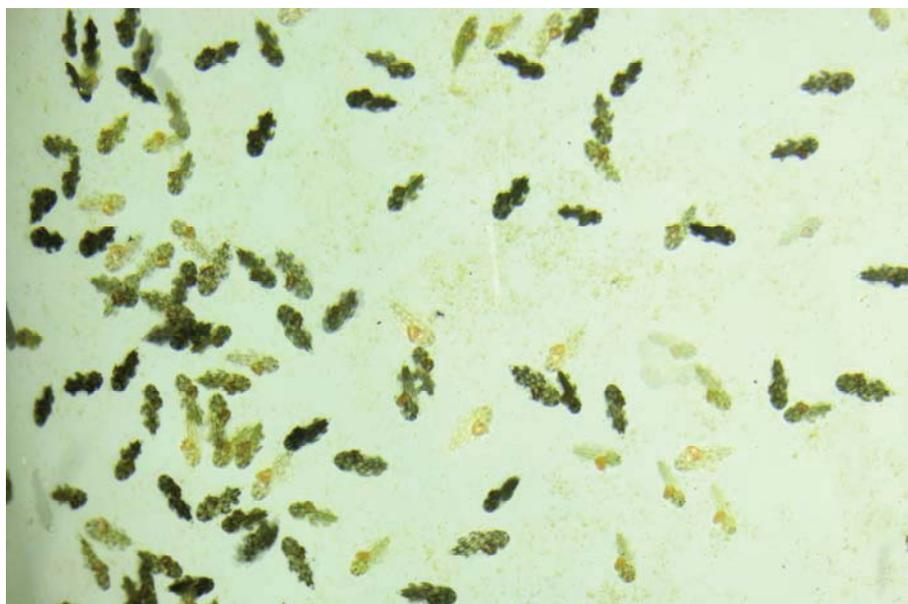


Figura 8. Postlarvas de *S. senegalensis*.

El cultivo larvario y la obtención de alevines en el lenguado senegalés es un proceso ya consolidado, sin grandes dificultades en la actualidad. Los actuales datos de producción indican que a pesar de que esta especie muestra una gran flexibilidad y aceptación de dietas comerciales no específicas, con buen crecimiento (Cañavate *et al.*, 2006), es necesaria una mejora de la alimentación en estas etapas y un cultivo acorde a

los requerimientos del lenguado, para la obtención de niveles de pigmentación adecuados y bajas tasas de malformaciones esqueléticas en los juveniles (Gavaia *et al.*, 2002; Estévez, 2004; Gisbert *et al.*, 2008).

Los estados premetamórficos del lenguado se caracterizan por presentar elevadas tasas de crecimiento y una gran resistencia, produciéndose la metamorfosis hacia los 20-21 días de edad (Fernández-Díaz *et al.*, 2001). Tras la apertura de la boca, las larvas son alimentadas con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y fitoplancton (*Nanochloropsis gaditana* e *Isochrysis galbana*) durante seis días, procediéndose a continuación a una coalimentación con *Artemia salina* y microencapsulado hasta día 40-60, momento en el que se inicia el destete (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999). Esta es una de las etapas críticas del cultivo del lenguado senegalés y la utilización a finales de los 90 de hidrolizados de harina de pescado (Day *et al.*, 1999) y microencapsulados con formulaciones específicas para esta especie (Aragao *et al.*, 2003b; Engrola *et al.*, 2005; Sáenz de Rodríguez *et al.*, 2005) han permitido producir alevines de 1-1.5g de peso a día 90-100 de cultivo (Cañavate, 2005) y alcanzar ya recientemente tasas de supervivencia de un 90% (comm.pers. O. Chereguini y C. Lobo; IEO Santander).

En cuanto a la producción de juveniles, son varios los factores que aún se necesitan optimizar tasas, frecuencias y horarios de alimentación, que contribuyan a modular la alta dispersión de tamaño, densidades de cultivo que aseguren el bienestar animal, dietas que reduzcan la susceptibilidad a enfermedades, etc.

En nuestro país son numerosos los estudios que han contribuido a un mayor conocimiento de la biología del lenguado senegalés para lograr el cultivo intensivo (Sarasquete *et al.*, 1998; Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999; Yúfera *et al.*, 1999; Fernández-Díaz *et al.*, 2001; Cara *et al.*, 2003; Boluda-Navarro *et al.*, 2004; Boluda-Navarro *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005; Villalta *et al.*, 2005; Guzmán *et al.*, 2008). Asimismo han sido numerosas las investigaciones llevadas a



Figura 9. Alevín de *S. senegalensis* en preengorde

cabo en Portugal con el mismo objetivo (Dinis, 1992; Dinis *et al.*, 1999; Gavaia *et al.*, 2002; Imsland *et al.*, 2003; Conceição *et al.*, 2007; Engrola *et al.*, 2009). Las empresas también han estado trabajando en la producción de dietas específicas para lenguado con diferentes porcentajes y fuentes lipídicas y en el desarrollo de nuevas tecnologías para contrarrestar la acción de los factores antinutricionales procedentes de las harinas vegetales incorporadas (Watanabe, 2002; Aragao *et al.*, 2003a). Todo este esfuerzo ha generado la expansión de la producción del lenguado senegalés, desde 50 Ton de juveniles en 2004 hasta 600 Ton en 2009, de las que 110 alcanzaron el tamaño comercial.

En cuanto a la etapa de engorde, la talla comercial se alcanza alrededor de los 14 meses, en las condiciones habituales de cultivo intensivo de alta densidad (100% de ocupación del fondo, 20 Kg/m²). Dicho cultivo se realiza tanto en circuito abierto como cerrado y a temperatura natural ó controlada (20°C). Las condiciones del medio de los ejemplares que crecen en circuito cerrado a temperatura controlada son más homogéneas y permiten un rendimiento mayor, si bien suponen un mayor coste económico. Sin embargo, existe un factor limitante en esta etapa del cultivo del lenguado senegalés como es el de la incidencia de patologías (Padrós *et al.*, 2003; Toranzo *et al.*, 2003). Entre los patógenos que afectan a esta especie, se encuentran *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Zorrilla *et al.*, 1999; Romalde, 2002; Arijo *et al.*, 2005a), *Vibrio harveyi* (Zorrilla *et al.*, 2003; Arijo *et al.*, 2005a) y algunas especies de *Tenacibaculum sp.* (Avendaño-Herrera *et al.*, 2005; Piñeiro-Vidal *et al.*, 2007; Piñeiro-Vidal *et al.*, 2008a; Piñeiro-Vidal *et al.*, 2008b). También han sido descritos *Birnavirus* (Rodríguez *et al.*, 1997) y *Lymphocystis sp.* (Alonso *et al.*, 2005). La mayoría de las enfermedades detectadas son oportunistas y afectan también a otras especies cultivadas. La aparición de estas patologías se ve favorecida por la aparición de acusadas situaciones de estrés como son temperaturas superiores a 22°C ó bruscas oscilaciones de la misma, cambios en la calidad del agua, descuidos en la higiene de los tanques, circulante, manejo ó transporte de ejemplares inadecuados.

Para lograr un mayor rendimiento en la etapa de engorde se precisa de una mayor investigación, tanto en la selección genética de posibles reproductores resistentes a dichas patologías, como en la nutrición y el desarrollo de las defensas naturales de los ejemplares en cultivo.

De todo lo expuesto con anterioridad se puede decir que el desarrollo integral del cultivo intensivo del lenguado senegalés a escala industrial en nuestro país, se encuentra comprometido por la incompleta puesta a punto de las técnicas reproductivas que aseguren un suministro constante de alevines de buena calidad y por la posible aparición de graves patologías durante todo el cultivo. En el IV Workshop de lenguado, celebrado en 2008 en Faro (Portugal) se evidenció el cierre de algunas empresas en el área mediterránea por incidencias severas de pasteurelisis, causada por *P. damsela* subsp. *piscicida*. Esta situación ha motivado en los últimos años un desplazamiento de los productores hacia la costa Atlántica de España y Portugal en dónde la temperatura del agua no es tan alta.

Además, los estudios económicos realizados no han considerado rentable su cultivo hasta el momento, dado que los costes de producción están entre 8-9 euros/ Kg, sin contar los derivados de la gestión y venta. Se ha calculado que para que una empresa obtenga beneficios con el cultivo del lenguado precisa producir 100 toneladas anuales.

Para ello necesita grandes extensiones de terreno ó el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan cultivar en condiciones de bienestar animal.

2.3. Avances en la investigación del lenguado senegalés

Para tratar de resolver los diferentes problemas surgidos en las distintas etapas del cultivo intensivo del lenguado senegalés y lograr su producción a nivel industrial, se han planteado desde 2002 tres Planes Nacionales de Investigación (PN), que han marcado un punto de inflexión en el cultivo de esta especie. Dichos Planes agrupan intereses públicos y privados de seis comunidades autónomas y cuentan con la financiación de la Junta Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR).

Las investigaciones realizadas durante el primer periodo (2002-2004) demostraron la viabilidad técnica y económica del cultivo intensivo del lenguado senegalés en diferentes áreas de nuestro país (Anguis y Cañavate, 2005; Peleteiro *et al.*, 2005) y también permitieron avances significativos en el conocimiento, tanto de los procesos hormonales implicados en su reproducción, como de las características de sus gametos masculinos, no consiguiéndose sin embargo la reproducción de la generación F1. Durante este primer PN se mejoraron los protocolos de cultivo larvario (Chereguini y Díez, 2003; Chereguini *et al.*, 2005a; Chereguini *et al.*, 2005b; Cañavate *et al.*, 2006) y destete preexistentes, mediante la selección de las dietas más adecuadas, establecimiento de los ritmos diarios de alimentación y la determinación de los requerimientos de lípidos, (Estévez, 2004; Villalta, 2007) cuyos resultados demostraron la viabilidad de la producción de alevines en cautividad (Olmedo *et al.*, 2003; Cañavate, 2005). Así mismo en este PN se realizaron estudios de crecimiento en la etapa de engorde en los diferentes centros de investigación de nuestro país, en los que se observó como la talla comercial para el lenguado (350 g) se alcanza en 14 meses a pesar de que la continua aparición de patologías dificultaba la reproducibilidad de los resultados (Olmedo *et al.*, 2003; García de la Banda *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2007; Olmedo *et al.*, 2007). Esta situación junto con la ausencia de reproducción en la generación F1 se establecieron como áreas prioritarias a investigar en el futuro. Todos los datos obtenidos se presentaron en el Informe Jacumar 2002-2004

Las investigaciones realizadas durante el segundo periodo (2006-2008) estuvieron centradas en resolver los principales factores que estaban limitando el cultivo intensivo del lenguado senegalés a escala industrial. En el área de la reproducción se trabajó en el efecto del uso de distintas dietas (natural y pienso) sobre el éxito reproductivo de los ejemplares en cautividad (Chereguini, 2006; Chereguini *et al.*, 2006; Anguis *et al.*, 2007a; Anguis *et al.*, 2007b; Cal *et al.*, 2007). Asimismo en los estudios realizados con la generación F1 se estableció que el factor que estaba limitando su reproducción era la existencia de una disfunción en los mecanismos de comunicación sexual durante el cortejo (Rasines *et al.*, 2007; Duncan *et al.*, 2008; Guzmán *et al.*, 2008; Mañanós *et al.*, 2008; Carazo *et al.*, 2009) causada probablemente por una alimentación deficitaria en las primeras etapas de vida. En el área sanitaria se valoró la aplicación de probióticos y su influencia en todas las etapas de cultivo (García de la Banda *et al.*, 2006; García de la Banda *et al.*, 2007a; García de la Banda *et al.*, 2007b; García de la Banda *et al.*, 2007c; García de la Banda *et al.*, 2008; Martínez-Manzanares *et al.*, 2008; García de la Banda *et al.*, 2009c; Tapia-Paniagua *et al.*, 2009a; Tapia-

Paniagua *et al.*, 2009b). y se caracterizaron las estirpes bacterianas procedentes de juveniles en cultivo de las diferentes áreas geográficas de nuestro país (Roque *et al.*, 2008). También se investigó sobre la influencia de la heterogeneidad del tamaño de los ejemplares sobre el crecimiento poblacional y se determinaron en juveniles de lenguado diferentes biomarcadores de estrés oxidativo (Manchado *et al.*, 2007; Manchado *et al.*, 2008). Otro de los estudios que se realizó fue la comparación entre diferentes densidades de cultivo y sus efectos sobre el estrés y la supresión de la respuesta inmune con el fin de compatibilizar la rentabilidad económica con el bienestar animal (Salas-Leiton *et al.*, 2008; Salas-Leiton *et al.*, 2010a). Los resultados obtenidos en las áreas sanitaria y de reproducción unidos a las nuevas tendencias investigativas en acuicultura establecieron la necesidad de profundizar en la reproducción de la F1 y optimizar los protocolos de empleo de probióticos en las diferentes etapas de cultivo para poder realizar su futura transferencia a la industria. Todos los datos obtenidos se presentaron en el Informe Jacumar 2006-2008.

El tercer PN de lenguado (2009-2011), vigente en la actualidad, comprende dos áreas de investigación: reproducción y prevención de enfermedades. La primera pretende hacer realidad la reproducción controlada de la F1 en cautividad y la segunda determinar las condiciones de cultivo en las que se pueden obtener las mejores respuesta inmune y resistencia frente a patógenos. Para conseguir el objetivo planteado en el área de reproducción se realizan experiencias con terapias hormonales productoras de las mayores tasas de ovulación, espermiación y desove natural en reproductores F1. Asimismo se está trabajando en el desarrollo y aplicación al lenguado senegalés de las técnicas de reproducción artificial preexistentes. Finalmente se están estudiando los distintos parámetros que afectan a la reproducción de la F1, como son la dieta, el sistema de cultivo y el tiempo de estabulación sobre la expresión génica de las hormonas sexuales (Rasines *et al.*, 2009). En cuanto a los objetivos planteados en el área de prevención de enfermedades se están determinando los niveles óptimos de respuesta inmune mediante la identificación y estudio de la ontogenia de los genes implicados y su posterior activación por acción de inmunoestimulantes, así como los cambios que se producen a nivel inmunológico como consecuencia de las diferentes condiciones de cultivo existentes (Salas-Leiton *et al.*, 2010a; Salas-Leiton *et al.*, 2010b). Y para conseguir las mejores respuesta inmune y de resistencia frente a patógenos se está trabajando en la optimización de los protocolos de empleo de probióticos en las diferentes etapas de cultivo (García de la Banda *et al.*, 2009a; García de la Banda *et al.*, 2009b; Lobo *et al.*, 2009; García de la Banda *et al.*, 2010; Lobo *et al.*, 2010; Tapia-Paniagua *et al.*, 2010c). Dichos protocolos podrán ser transferidos en el futuro a las empresas de nuestro país. Continúan durante este año 2011 las experiencias proyectadas dentro del tercer PN en curso.

La investigación sobre el lenguado senegalés en nuestro país ha aumentado en los últimos años. A los resultados obtenidos en los tres PN de lenguado de la JACUMAR hay que añadir los derivados de proyectos de investigación apoyados tanto por fondos de la Unión Europea como por fondos del actual Ministerio de Ciencia e Innovación Tecnológica u organismos de las Comunidades Autónomas. Prueba de dicho esfuerzo es el elevado número de publicaciones y comunicaciones presentadas a congresos en las áreas de la reproducción (Cerdá *et al.*, 2008), control y prevención de enfermedades (Roque *et al.*, 2008; Santos, 2008; Zarza y Padrós, 2008; Fuentes-Edfuf *et al.*, 2009; García-González *et al.*, 2009; Araújo *et al.*, 2010; Medina *et al.*, 2010; Salas-Leiton *et*

al., 2010a), producción (Arjona *et al.*, 2007; Manchado *et al.*, 2007; Mancera *et al.*, 2008; Arjona *et al.*, 2009; Manchado *et al.*, 2009; Almansa *et al.*, 2010; Asensio *et al.*, 2010; Blanco-Vives *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2010) y nutrición (Rodiles *et al.*, 2007; Rodiles *et al.*, 2008; Rodiles *et al.*, 2009a; Sáenz de Rodrigañez *et al.*, 2009; Garcia de la Banda *et al.*, 2010; Peleteiro *et al.*, 2010; Salas-Leiton *et al.*, 2010c). Del mismo modo el incremento investigativo en esta especie en Portugal ha generado numerosas aportaciones científicas (Cabrita *et al.*, 2008; Costas *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2008; Gavaia, 2008; Oiestad y Sparboe, 2008; Poussao-Ferreira, 2008; Silva *et al.*, 2009; Costas *et al.*, 2010; Guerreiro *et al.*, 2010; Valente *et al.*, 2010a; Valente *et al.*, 2010b).

Hay que decir que los objetivos planteados tanto en el último PN de lenguado (2009-2011), como en el resto de investigaciones sobre esta especie, coinciden plenamente con los que se definieron como prioritarios en el IV Workshop internacional de lenguado celebrado en Faro (Portugal) en 2008. Y que éste interés creciente por la investigación en lenguado lo compartimos con Portugal, ya que teniendo en cuenta la aportación de ambos países, se presentaron 39 comunicaciones sobre esta especie en el último Congreso Europeo de Acuicultura (Oporto, 2010), lo que supone un porcentaje significativo del total expuesto (770). Cabe destacar que más de la mitad de todas las comunicaciones de lenguado estuvieron enfocadas a resolver los principales factores limitantes de la etapa de engorde en esta especie, como son su nutrición y la aparición de patologías.

3. Factores limitantes del engorde de lenguado senegalés.

3.1. Patologías en el lenguado senegalés

El conocimiento, prevención y tratamiento de las patologías existentes es posiblemente el factor limitante más importante en la actualidad para el engorde del lenguado senegalés. Tal es su importancia que la no resolución del mismo ha llevado en los últimos años al cierre de varias empresas situadas en el área mediterránea de nuestro país.

La mayor parte de las enfermedades detectadas en el cultivo de *S.senegalensis* son de carácter oportunista y afectan también a otras especies cultivadas. Las patologías observadas están generalmente asociadas a la inestabilidad ambiental (baja calidad del agua, temperaturas superiores a 22°C ó cambios bruscos en la misma), protocolos de manejo e higiene deficientes, dietas por debajo del óptimo para el desarrollo del ejemplar en cultivo intensivo, cohabitación con otras especies susceptibles a la enfermedad y medidas terapéuticas deficientes (Zarza y Padrós, 2008). Una problemática añadida en el caso del lenguado senegalés es que los síntomas suelen aparecer tarde, cuando la enfermedad ya está declarada, lo que obliga a una intervención antibiótica de choque, que debilita aún más a los ejemplares.

Las tres patologías que en la actualidad más limitan el desarrollo de la etapa de engorde en el cultivo del lenguado senegalés son la pasteurelosis (Zorrilla *et al.*, 1999; Romalde, 2002; Arijo *et al.*, 2005a), la flexibacteriosis ó tenacibaculosis (Toranzo *et al.*,

2003; Zarza y Padrós, 2008) y la vibriosis (Zorrilla *et al.*, 2003; Arijo *et al.*, 2005a; Zarza *et al.*, 2005).

La pasteurelosis ó pseudotuberculosis es considerada la patología más grave para las piscifactorías de lenguado, ya que puede llegar a causar mortalidades elevadas (hasta del 100%) (Ghittino *et al.*, 2003; Howell *et al.*, 2006). Su aparición está asociada tanto a la existencia de altas temperaturas como a la cohabitación en la misma instalación del lenguado con otras especies susceptibles como son la dorada (*S. aurata*) y la lubina (*D. labrax*) (Zarza *et al.*, 2005). Afecta sobre todo al área Mediterránea, de elevadas temperaturas en época estival. Esta enfermedad está causada por *P. damsela* subsp. *piscicida* (Kubota *et al.*, 1970) y se denomina así porque en los casos crónicos, los peces enfermos presentan gránulos blancos en sus órganos internos. No tiene especificidad por el hospedador por lo que puede suponer un riesgo para otras especies marinas en las que aún no se ha descrito. Los ejemplares de lenguado afectados presentan un cuadro septicémico agudo ó sobreagudo. Externamente no suelen presentar lesiones, pero sí una característica pigmentación oscura y la cavidad abdominal inflamada. En algunos casos, también se ha detectado exoftalmia hemorrágica, pequeñas úlceras en la piel y palidez branquial (Zorrilla *et al.*, 1999). Al abrir al ejemplar enfermo, se puede observar la presencia de palidez en hígado y riñón, así como gránulos blancos (1-2 mm) en bazo.

La tenacibaculosis o flexibacteriosis marina es una patología causada especialmente por *Tennacibaculum maritimum*, aunque se han encontrado también otras especies causantes pertenecientes al mismo género como son: *T. gallaicum*, *T. discolor* y *T. soleae* (Avendaño-Herrera *et al.*, 2005; Piñeiro-Vidal *et al.*, 2007; Piñeiro-Vidal *et al.*, 2008a; Piñeiro-Vidal *et al.*, 2008b). Dichas bacterias han sido aisladas procedentes de episodios patológicos ocurridos en piscifactorías de nuestro país, tanto a partir de ejemplares infectados como a partir del agua del tanque de cultivo en el que se encontraban (Piñeiro-Vidal *et al.*, 2007; Piñeiro-Vidal *et al.*, 2008a; Piñeiro-Vidal *et al.*, 2008b). *T. gallaicum* y *T. discolor* son antigénicamente diferentes a *T. maritimum*, hecho que debe ser tenido en cuenta para las preparaciones y programas vacunales (Santos, 2008). Su aparición está asociada tanto a la variación de la temperatura como a situaciones estresantes durante el cultivo como pueden ser el destete larvario, el traslado de ejemplares y el inadecuado manejo y se presenta sobre todo en las piscifactorías del Norte de España. Se trata de una enfermedad ulcerativa que afecta no sólo al cultivo de *S. senegalensis*, sino también a importantes especies como son el rodaballo, el lenguado común, el salmón atlántico, la dorada y la lubina. Esta patología es responsable de grandes pérdidas económicas pudiendo llegar a producir mortalidades importantes. Los signos clínicos de la enfermedad son progresivos y varían entre las distintas especies. En el lenguado senegalés los peces afectados inicialmente presentan pequeñas erosiones en la piel que con el tiempo pueden evolucionar a amplias úlceras profundas sobre todo situadas en la boca, la cara dorsal y las aletas. El pez fallece como consecuencia de una infección sistémica.

Mientras que la pasteurelosis se ha registrado con mayor asiduidad en la etapa de engorde, la flexibacteriosis lo ha sido en la etapa de destete larvario y preengorde.

Otra de las patologías que aparece con mayor frecuencia en las piscifactorías de lenguado es la vibriosis. En el Mediterráneo se han descrito varios episodios causados por *V. harveyi* (Zorrilla *et al.*, 2003; Arijo *et al.*, 2005a) y *Listonella anguillarum*

serotipo O₁ y en el Cantábrico y Atlántico también por *L. anguillarum* serotipo O₂ y *Vibrio alginolyticus* (Zarza *et al.*, 2005). En este último área geográfica los episodios de vibriosis descritos a veces están asociados a infecciones causadas por *Tennacibaculum sp.* Estas infecciones son de tipo oportunista, y estudios sobre la microbiota habitual de lenguados en cultivo en nuestro país describen al género *Vibrio sp.* como el más frecuente (Roque *et al.*, 2008), registrándose diferente composición específica dependiendo del tipo de cultivo, intensivo o extensivo (Martín-Antonio *et al.*, 2007). Los peces con sintomatología típica de vibriosis suelen presentar heridas en su superficie que pueden llegar a ser ulcerosas en el estadio más desarrollado de la enfermedad, muriendo como consecuencia de una septicemia hemorrágica (Zarza *et al.*, 2005).

También se han citado episodios en lenguado senegalés de parasitosis internas causadas por microsporidios ó mixosporidios renales o intestinales y por parasitosis externas causadas por *Amylodonium*, *Cryptobya* y *Cryptocarium*. Presentándose estas tres últimas parasitosis muy agresivas al afectar a ejemplares cultivados en circuito cerrado (Zarza *et al.*, 2005). Asimismo indicar que en el cultivo del lenguado senegalés también han sido descritos episodios de mixobacteriosis y cierta prevalencia de virus (Alonso *et al.*, 2005; Cano *et al.*, 2010) con episodios de *Birnavirus* (Rodríguez *et al.*, 1997) y *Lymphocystis sp.* (Alonso *et al.*, 2005).

Con el fin de conocer las principales enfermedades y crear métodos efectivos para prevenir su aparición ó impedir su desarrollo en el cultivo del lenguado senegalés, existen numerosas investigaciones sobre los distintos patógenos que afectan al mismo (Rodríguez *et al.*, 1997; Zorrilla *et al.*, 1999; Cepeda y Santos, 2002; Padrós *et al.*, 2003; Toranzo *et al.*, 2003; Arijo *et al.*, 2005a; Zarza *et al.*, 2005; Howell *et al.*, 2006; Roque *et al.*, 2008; Santos, 2008; García-González *et al.*, 2009; Araújo *et al.*, 2010; Medina *et al.*, 2010). La mayor parte de los trabajos han sido realizados en los últimos diez años, de modo paralelo al desarrollo del cultivo industrial de esta especie en la Península Ibérica.

3.2. Utilización de piensos comerciales no específicos

La utilización de piensos comerciales diseñados para especies ya introducidas en el mercado en el cultivo del lenguado senegalés, ha generado menores tasas de crecimiento y eficiencia nutritiva, hígados grasos y peor condición de los ejemplares. Los requisitos nutricionales del lenguado senegalés en la naturaleza son bien diferentes de los detectados en dorada o rodaballo, por lo que los piensos comerciales no pueden ser genéricos sino que han de ser formulados específicamente.

La producción en acuicultura depende, en buena medida, del “status” fisiológico de los ejemplares. Los actuales sistemas de producción intensiva suponen un estrés para los ejemplares en cultivo, llevan consigo frecuentemente una menor eficiencia digestiva y una mayor susceptibilidad frente a patógenos potenciales, lo que ocasiona finalmente pérdidas económicas para la industria. En los últimos años, en la producción acuícola, se está dando una mayor importancia al efecto positivo que tiene una adecuada alimentación sobre el bienestar de los ejemplares en cultivo y sobre la prevención de la aparición de patologías. Una nutrición adecuada, que cubra todos las necesidades

nutritivas de los individuos, producirá peces más fuertes, menos susceptibles a sufrir enfermedades y más resistentes frente al estrés.

A pesar de la persistencia de patologías en el cultivo de lenguado senegalés, no hay evidencia de que ésta sea una especie más susceptible que otras a las infecciones bacterianas. Más bien, la aparición de estas patologías puede estar relacionada con el empleo de piensos comerciales no específicos. La selección de una dieta y un adecuado protocolo de cultivo para el lenguado senegalés precisan tener en cuenta tanto la alimentación como los hábitos de vida del mismo en la naturaleza.

A finales de los 90, cuando los requerimientos nutricionales del lenguado senegalés no eran aún conocidos, se pensó que podrían parecerse a los de los otros peces planos más estudiados como el halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) ó el rodaballo (Askness *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2003a). Sin embargo, Hebb *et al.* (2003) observaron como en la platija (*Pleuronectes platesa*) se conseguía un crecimiento significativamente mayor, con piensos con una relación proteína/lípido superior a la utilizada para las dos anteriores especies (50/10 frente a 40/20).

Boluda-Navarro *et al.* (2005) realizaron un trabajo de autoselección de macronutrientes con juveniles de lenguado senegalés, con el fin de conocer las necesidades de proteína y lípidos totales, y poder formular un pienso específico. Dichos investigadores observaron como los ejemplares se inclinaban por una dieta con un elevado nivel de proteínas (55-68%), frente a un 13-20% de lípidos y 16-25% de carbohidratos. Dos años más tarde, Rodiles *et al.* (2007) coincidieron en dicha observación y demostraron que el lenguado senegalés en su etapa de engorde necesitaba niveles de proteína superiores al 45% (situándose el óptimo en el 55%) y niveles de lípidos inferiores al 17 %. Estudios más recientes han ajustado aún más los niveles, situando las proteínas por encima del 53% (con un óptimo entre 55-57%) y los lípidos en el 8% para esta especie (Borges *et al.*, 2009; Rodiles *et al.*, 2009a; Rodiles *et al.*, 2009b; Guerreiro *et al.*, 2010). Además en la etapa de preengorde (1-20g), el nivel proteico aconsejado es superior al requerido en la siguiente etapa, alcanzando el 60% (Rodiles *et al.*, 2008). Esto es debido a que la incorporación en la dieta de una mayor cantidad de proteína favorece el rápido crecimiento de esta especie observado en la fase de alevinaje.

Los trabajos anteriormente mencionados han constituido un gran avance para el desarrollo del cultivo del lenguado senegalés, puesto que la precisión en el índice de proteína/lípido de las materias primas mejora tanto los niveles de retención proteica del pienso como el índice de conversión de los ejemplares en cultivo (Daniels y Robinson, 1986). Además el establecimiento del índice adecuado para una determinada especie evita la aparición de depósitos de grasa en los peces (Cowey, 1975) y reduce las emisiones del nitrógeno y fósforo sobrantes al medio acuático. (García-Díez, 2002).

El requerimiento proteico se define como el nivel de proteína en dieta que tiende a maximizar simultáneamente el crecimiento y la retención proteica (Weatherley y Gill, 1987). Tanto desde el punto de vista nutricional como económico, es más indicado usar los lípidos ó los carbohidratos como fuentes de energía y así conseguir el denominado “efecto ahorrador de proteínas”, término acuñado por Jauncey y Ross (1982). De este modo casi toda la proteína se empleará para el crecimiento, disminuyéndose los costes de producción del alimento (Carter y Houlihan, 2001). En el caso específico de los

peces planos se encuentra una controversia en el ahorro proteico mediante el incremento del nivel lipídico. Este aumento es beneficioso para el rodaballo, (Bromley, 1980), y la platija (Cowey, 1975), no así para el halibut (Martins *et al.*, 2007) y el lenguado senegalés (Dias *et al.*, 2004).

Los aminoácidos son las unidades básicas de las proteínas. De los 20 existentes, diez son esenciales y deben de ser tomados directamente de la dieta por los peces. Se sabe que la composición corporal en aminoácidos es similar entre especies y se ve poco afectada por la temperatura, tasa de alimentación ó tamaño del animal, aunque se trata de un campo complejo dadas las interacciones que existen entre ellos y con otros compuestos (Wilson y Poe, 1985). En el lenguado senegalés, así como en otras especies, existe una literatura emergente que define el papel de los aminoácidos como moléculas cruciales para el mantenimiento, el crecimiento y la respuesta inmune de los ejemplares en cultivo (Aragao *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). De hecho, se ha observado cómo juveniles de esta especie sometidos a estrés por manejo semanal presentaron en el plasma niveles inferiores de alguno de sus aminoácidos libres (Aragao *et al.*, 2008). Además dicha concentración de aminoácidos libres en el plasma del lenguado senegalés y de otras especies de peces en cultivo puede servir para determinar el requerimiento de los mismos (Wilson y Poe, 1985).

La principal fuente de proteínas y aminoácidos esenciales en las dietas para peces (20-60%) es la harina de pescado debido a su alto valor nutritivo y a su adecuada palatabilidad (Watanabe, 2002). Es a partir de las recomendaciones de la FAO (FAO, 2007b), en las que se pedía la disminución en el empleo de materias primas (harinas y aceites) procedentes de la pesca extractiva para producir alimentos en acuicultura, cuando se ha comenzado a observar un aumento en el número de investigaciones sobre nuevas fuentes de proteína alternativas más económicas y sostenibles. Existen un gran número de trabajos en los que se demuestra la posibilidad de sustitución parcial de harina de pescado por harinas vegetales, sin que ello afecte al crecimiento ni al rendimiento productivo del pienso (Robaina *et al.*, 1995; Robaina *et al.*, 1998; Glencross *et al.*, 2003). Sin embargo, entre los principales factores que limitan el uso de las materias primas vegetales en las dietas para peces, están sus características nutritivas, problemas de digestibilidad y alto contenido en factores antinutricionales (Robaina y Schuchardt, 2009). Para paliar este problema, la industria ha desarrollado nuevas tecnologías de descascarillado, calentamiento a altas temperaturas, extrusión, etc (Glencross *et al.*, 2007).

Estudios recientes realizados con juveniles de lenguado senegalés han demostrado que un balance adecuado de aminoácidos en dieta permite la sustitución del 100% de las harinas de pescado por harinas de origen vegetal, sin llegar a comprometer el crecimiento ó el metabolismo proteico de esta especie durante su engorde (Silva *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010; Valente *et al.*, 2010a; Valente *et al.*, 2010b). Además, los parámetros inmunológicos inespecíficos no se han visto afectados por estos altos porcentajes de sustitución (Silva *et al.*, 2009) e incluso han mejorado tras la alimentación durante tres meses con dietas vegetales de muy bajo nivel de harinas de pescado (5%) y suplementadas con lisina ó con una mezcla específica de aminoácidos esenciales (Costas *et al.*, 2010). Sin embargo, Rodiles *et al.* (2010) observaron como en juveniles de lenguado senegalés la sustitución parcial (30%) de harinas de pescado por harinas vegetales, produce un nivel de lípidos y un perfil de ácidos grasos esenciales

diferente en intestino, hígado y músculo, si bien el nivel de ácidos grasos de la serie n-3 y el crecimiento no se ven afectados. Estas observaciones coinciden con las de otros investigadores que han demostrado como la cantidad y calidad de la proteína existente en la dieta afecta al metabolismo lipídico del lenguado y la dorada, modificando tanto el nivel como la calidad de la grasa almacenada (Robaina *et al.*, 1998; Robaina *et al.*, 1999; Morais *et al.*, 2005b). Además la proteína dietética afecta a las propiedades organolépticas del filete de pescado ya que puede modificar la susceptibilidad a la oxidación de los ácidos grasos dentro del músculo ocasionando cambios en la textura del mismo (López-Bote *et al.*, 2001).

Los lípidos están implicados en una multitud de procesos fisiológicos a nivel celular como son: el almacenamiento y la producción de energía, la formación de membranas, el transporte de nutrientes (lipoproteínas), la modulación de la glucogenolisis ó la producción de hormonas y eicosanoides implicados en procesos antiinflamatorios e inmunológicos.

En el lenguado senegalés al igual que en el resto de los peces marinos, los lípidos están formados por una gran variedad de ácidos grasos saturados y monoinsaturados que el individuo es capaz de sintetizar, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de las series n-3 y n-6 los ha de incorporar a través de la dieta (Izquierdo, 2005). Dentro de todos los ácidos grasos esenciales, el docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), el eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y el araquidónico (ARA, 20:4n-6) tienen una función muy importante para los peces al igual que para la mayor parte de los vertebrados. Se pueden encontrar dentro de los triglicéridos (depósito de grasas) ó principalmente formando parte de los fosfolípidos en las membranas celulares, que en los peces cuentan además con una gran cantidad de los ácidos grasos 16:0 y 18:1n-9. Los fosfolípidos en los peces contienen alrededor de un 50% de sus ácidos grasos totales como PUFAs, y presentan una relación característica DHA/EPA, aunque este índice varía según el órgano o el fosfolípido en cuestión (Sargent *et al.*, 1999a).

Los ácidos grasos altamente insaturados (PUFAs) de la serie n-3, DHA y EPA, son necesarios para el crecimiento y desarrollo adecuado de los peces (Izquierdo, 1999). Así, dietas con altos contenidos en n-3 promueven la estabilidad de las membranas celulares (Erdal *et al.*, 1991), efecto de gran interés para los animales acuáticos, donde resulta esencial mantener las propiedades funcionales de éstas frente a los cambios en la temperatura del medio. Más recientemente se ha comprobado la importancia del ácido graso ARA, perteneciente a la serie n-6, en la expresión de genes relacionados con el estrés y con la fertilidad de los reproductores (Estévez *et al.*, 1999; Villalta *et al.*, 2008). Estos tres ácidos grasos esenciales (DHA, EPA y ARA) además de influir en la fluidez, permeabilidad y actividad enzimática de la membrana, son precursores de prostaglandinas y leucotrienos (Broughton *et al.*, 1991). Por tanto, su papel es determinante en los procesos de absorción y modulación de la respuesta inflamatoria. Una alta relación en el índice de PUFAs n3/n6 reduce la susceptibilidad al estrés en el salmón (Bell *et al.*, 1991), mientras que las dietas deficientes en estos ácidos grasos esenciales reducen la actividad defensiva de macrófagos en la trucha arcoiris (Kiron *et al.*, 1995).

Existe una relación entre el perfil de ácidos grasos en la dieta y el encontrado en el músculo de los ejemplares (Caballero *et al.*, 2002; Izquierdo *et al.*, 2003). El conocimiento de la relación óptima existente entre dichos tres ácidos grasos esenciales

en la dieta y en el tejido de una determinada especie acuícola es fundamental para producir el alimento más adecuado (Sargent *et al.*, 1999b).

Para varias especies marinas ya consolidadas como son el rodaballo, la dorada y la lubina, niveles dietarios de ácidos grasos del 1% ó inferiores, expresados en peso seco de la dieta, suponen tener cubiertas las necesidades en ácidos grasos esenciales (Ibeas *et al.*, 1996). Sin embargo, al igual que en la etapa de engorde del lenguado senegalés, en algunas especies de reciente introducción en acuicultura, como el fletán ó el bacalao, están aún por definir dichos requerimientos. Se conoce, sin embargo, el trabajo de Kim *et al.* (2002) en el que se describe la importancia para el crecimiento normal del lenguado japonés (*P. olivaceus*) del aporte en dieta de PUFAs esenciales de la serie n-3 y también la influencia de la composición lipídica utilizada sobre la estructura del hepatocito y los metabolitos en suero. Estos autores determinaron un índice de 0,7 en C18:1 / n-3 para los ejemplares alimentados con dietas marinas como un indicador adecuado del estado de ácidos grasos esenciales. El índice de glucosa en suero también fue superior que al de los peces que recibieron dietas lipídicas de otro origen (Kim *et al.*, 2002), datos que coinciden con los descritos por Lee (2003b). Asimismo se han determinado niveles dietéticos de lípidos de 0,9% para la platija estrellada (*Platichthys stellatus*) (Lee *et al.*, 2003b). No obstante, el estudio realizado por Morais *et al.* (2006a) en larvas de *S. senegalensis* y citado con anterioridad, mostró que la composición en lípidos afecta más que la cantidad total de los mismos, influyendo en la ingesta, digestibilidad y estimulación de las rutas neuroendocrinas. Estos resultados coinciden con los observados por Salas-Leiton *et al.* (2010c).

La comparación de perfiles lipídicos en los tejidos de ejemplares salvajes y de cultivo aporta una información muy útil a la hora de diseñar un pienso, siendo el primero considerado como óptimo (Sargent *et al.*, 1999b) y el segundo indicador de posibles carencias a corregir en subsiguientes formulaciones (Rodríguez y Souto, 2004).

El hígado puede ser considerado un indicador del estado nutricional y fisiológico del ejemplar en cultivo (Robaina *et al.*, 1997; Caballero *et al.*, 1999). Como se ha dicho con anterioridad, las primeras dietas comerciales empleadas para el engorde del lenguado senegalés tenían bajos niveles de proteína y altos de lípidos, por lo que contribuyeron en su mayor parte a la producción de ejemplares con hígados grasos (Rueda-Jasso *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2010). En todos los casos, aunque el hígado se vio afectado, no ocurrió lo mismo con el músculo de los ejemplares, dado que la deposición de grasa en el lenguado se produce generalmente debajo de la piel y en las aletas (Borges *et al.*, 2009).

La principal fuente de lípidos en las dietas para peces son los aceites y harinas de pescado que son ricos en ácidos grasos altamente insaturados, con elevados contenidos en 22:6n-3 (DHA) y 20:5n-3 (EPA). Poseen además cantidades importantes de 20:4n-6 (ARA) y de ácidos grasos saturados como 16:0 y 18:0 y monoinsaturados como 18:1n-9. Además los aceites procedentes de pesquerías realizadas en el hemisferio Norte contienen niveles altos de 20:1n-9 y 22:1n-11 (Sargent *et al.*, 1999a). Dado que la principal fuente de ácidos grasos esenciales de la serie n-3 para el hombre es el pescado, resulta necesario asegurar la correcta nutrición de los ejemplares para conseguir un desarrollo y bienestar apropiado de los mismos, y garantizar su calidad para consumo humano. El cultivo de especies marinas con dietas ricas en harinas y aceites de pescado ha hecho posible un producto de alta calidad, con niveles de PUFAs de la serie n-3

mayores que los correspondientes a las especies salvajes. Sin embargo, dada la crisis que atraviesa el sector pesquero (FAO, 2009), en los últimos años se está trabajando en la sustitución de aceites de pescado por aceites de origen vegetal. En estudios realizados con trucha alpina (*Salvelinus alpinus*) y dorada, se observó como dicha sustitución durante largos periodos de tiempo afectaba negativamente al balance nutricional y osmótico de los peces, disminuyendo asimismo los parámetros inmunológicos y la resistencia frente a las enfermedades (Olsen *et al.*, 1999; Montero *et al.*, 2003; Montero *et al.*, 2008). Además el perfil de ácidos grasos del músculo de los ejemplares en las experiencias reflejó el correspondiente al del aceite vegetal empleado, con mayor nivel de ácidos grasos de la serie n-6 y menor de la serie n-3 (Montero *et al.*, 2003; Regost *et al.*, 2003), disminuyendo el efecto beneficioso característico del pescado.

Si bien se ha descrito una peor condición nutritiva y de resistencia a enfermedades de peces (Olsen *et al.*, 1999) (Castell *et al.*, 1994) asociada a la sustitución parcial de aceite de pescado por aceites vegetales con niveles elevados de ácidos linoleico (18:2n-6), oleico (18:1n-9) y linolénico (18:3n-3), resulta posible recuperar el perfil lipídico original mediante el empleo de una dieta de finalizado rica en aceites de origen marino (Montero *et al.*, 2005). El uso de aceites vegetales además de disminuir la presión sobre las pesquerías aporta un menor contenido en PCBs, dioxinas y metales pesados (Bell y Waagbo, 2008). Por todo ello, y dadas las recomendaciones de la FAO, está creciendo el número de investigaciones a la búsqueda de organismos unicelulares potenciales como productores de ácidos grasos esenciales para el futuro (Estévez *et al.*, 1999; Sargent *et al.*, 1999b; Higashiyama *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002).

4. Mejoras en la etapa de engorde

4.1. Prevención y tratamiento de patologías en el lenguado senegalés

Los antibióticos son los principales agentes utilizados para el control de las infecciones en las piscifactorías, siendo la tetraciclina uno de los más empleados, aunque la aparición de cepas resistentes ha reducido su eficacia (Thyssen y Ollevier, 2001). El tradicional empleo de los antibióticos ha ayudado al control de las enfermedades, pero también ha supuesto la aparición de bacterias resistentes de amplia dispersión en la actualidad, tanto en los ejemplares en cultivo (Radu *et al.*, 2003; Zorrilla *et al.*, 2003; Akinbowale *et al.*, 2006), como en el medio marino y sedimentos cercanos a las piscifactorías (Boon y Cattanch, 1999; Chelossi *et al.*, 2003). Estas prácticas está demostrado que ejercen un riesgo para la salud humana (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008) y para el medio ambiente, debido a la transferencia de genes resistentes entre bacterias (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001). A dicha transferencia de la resistencia bacteriana también ha contribuido el manejo inadecuado de los protocolos de administración de los antibióticos (Peeters y Rodríguez, 1999), debido al escaso control dentro de las instalaciones acuícolas. Además, en el caso de *P. damsela* subsp. *piscicida*, bacteria de gran virulencia para el lenguado senegalés, se ha demostrado que puede permanecer como parásito en el interior de los macrófagos de su huésped (Díaz-Rosales, 2006). Por esto, el empleo de antibióticos no tendría mucho efecto para el control de la pasteurelosis durante este periodo

Así, en el IV Workshop de lenguado (Faro, 2008), se estableció como prioridad el desarrollo de vacunas y terapias alternativas al empleo de antibióticos que contribuyan a reducir la incidencia de las dos principales enfermedades para esta especie: pasteurelisis y tenacibaculosis. Además las nuevas directivas europeas, con el fin de obtener un producto final saludable, con calidad para el consumidor y respetuoso con el medio ambiente, están obligando a las piscifactorias a establecer sistemas de control continuos de su producción acuícola desde su origen hasta su venta mercado.

Todas éstas razones hacen necesario el trabajo en ámbitos preventivos como son el uso de vacunas, el empleo de inmunoestimulantes y probióticos (Cuesta *et al.*, 2003; Zorrilla *et al.*, 2003; Makridis *et al.*, 2004; Planas *et al.*, 2006) que promueven el bienestar de los ejemplares y protegen el medio ambiente.

La vacunación es un método profiláctico específico con buenos resultados frente a algunas enfermedades, con buenos resultados frente a la pasteurelisis y vibriosis para dorada y lubina en distintos países de la cuenca mediterránea con vacunas como la diseñada por Magariños *et al.* (1994). También se ha ensayado, con prometedoros resultados, una vacuna divalente para el lenguado senegalés. Sin embargo, aún es necesario optimizar el tiempo de actuación de esta vacuna, formada por bacterinas y ECPs (proteínas extracelulares) de *P. damsela* subsp. *piscicida* inactivadas con formol (Arijo *et al.*, 2005b) para su uso con fines comerciales. Igualmente, se está empleando una vacuna frente a *Tenacibaculum* sp. y *Vibrio anguillarum* en esta especie.

Los inmunoestimulantes son compuestos que activan los mecanismos de defensa inespecíficos (Lall, 2000; Verlhac y Kiron, 2004). Son agentes más seguros que los antibióticos y su rango de eficacia es más amplio que el de las vacunas, si bien su duración es menor. Su uso se justifica por las frecuentes situaciones de estrés derivadas del cultivo intensivo que reducen la respuesta inmunitaria de los ejemplares, haciéndolos más susceptibles a las infecciones. Es por ello por lo que Sakai (1999) sugirió como estrategia para la prevención de enfermedades en piscicultura el uso combinado de inmunoestimulantes y vacunas, por su efecto sinérgico.

La mayoría de los compuestos que han demostrado tener actividad inmunoestimulante de microorganismos: lipopolisacáridos (endotoxinas) de bacterias GRAM -, peptidoglicanos de bacterias GRAM + y β -glucanos de hongos como *Sacharomyces cerevisiae* y *Sclerotium glaucanicum*. Se ha observado como la adición de β -glucanos comerciales (Macrogard) en dieta activa la respuesta inmune innata y específica de la lubina (*D. labrax*), si bien el efecto decrece ó desaparece con el tiempo y está influido por la temperatura (Bagni *et al.*, 2005).

Además en los últimos años se está investigando la presencia de sustancias inmunoestimulantes en diferentes organismos marinos que pudieran ser empleados con fines terapéuticos tanto para el ser humano como para su uso en piscicultura. Se han encontrado compuestos con capacidad inmunoestimulante en las algas (Blinkova *et al.*, 2001; Díaz-Rosales *et al.*, 2005; Valente *et al.*, 2006) y en productos extraídos de las mismas como PUFAs (Bell *et al.*, 1985; Salvesen *et al.*, 2000; Koven *et al.*, 2001), carotenoides (Aguilera y Amat, 2007), vitaminas (Cuesta *et al.*, 2001; Cuesta *et al.*, 2002), β -glucanos (Castro *et al.*, 1999; Couso *et al.*, 2003; Bagni *et al.*, 2005) y alginatos (Skjermo y Bergh, 2004; Bagni *et al.*, 2005). Este hecho, junto con el poder aglutinante que procuran las algas en el procesado de las dietas (Hashim y Mat-Saat,

1992); y el incremento del contenido proteico que aportan (Robaina y Schuchardt, 2009) las ha introducido en la formulación de piensos en acuicultura (Skretting, 2005).

Finalmente los probióticos (células microbianas administradas oralmente, con un efecto positivo para la salud del hospedador) comienzan a ser una herramienta muy eficaz para la prevención de patologías en acuicultura. Por el momento no son bien conocidos sus complejos modos de actuación, pero hay cada vez mayor número de trabajos que aconsejan su incorporación a dietas para acuicultura. Se ha observado su influencia tanto en la protección frente a patógenos y estimulación inmune, como en la modulación y mejora del tracto gastrointestinal asociada a la mayor digestibilidad nutritiva y bienestar animal.

Su aplicación a nivel industrial permitirá apoyar los requerimientos nutritivos, enzimáticos e inmunológicos durante la etapa larvaria, mantener altos niveles de calidad y bienestar en los alevines y juveniles e incluso podrá ser empleada para la mejora de la reproducción. Asimismo, la utilización de probióticos supone una reducción en el uso generalizado de antibióticos y tratamientos químicos profilácticos.

Según la legislación de la UE sobre el uso de probióticos en alimentación animal, estos ingredientes están clasificados como “aditivos zootécnicos”, por lo que están sujetos a evaluación y regulación científica estricta. El primer probiótico aprobado por la UE ha sido para pienso de salmónidos. Surgió dentro de un proyecto de investigación y desarrollo (OFIMER) iniciado en 2002 y en el que participaron las empresas de alimentación animal Biomar y Lallemand y los institutos de investigación franceses INRA e IFREMER. Los resultados observados con la aplicación de este probiótico fueron la reducción en el porcentaje de deformidades óseas, la mejora en el metabolismo, el aumento de la eficiencia en la digestión de la materia seca y la reducción del riesgo de gastroenteritis. Se ha comprobado además que este pienso con probiótico administrado desde la etapa de destete da los mejores resultados.

4.2. Desarrollo de dietas específicas

Los piensos comerciales utilizados en el engorde del lenguado senegalés han ido evolucionando a lo largo de la última década desde menores niveles de proteínas (50%) hasta los actuales (57%), incorporando además materias primas diferentes, como harinas de maíz en lugar de almidón de trigo (Skretting, 2005). La selección de una u otra fuente dietética puede afectar a la calidad final del pienso y determinará unas consecuencias finales en la salud y bienestar de los ejemplares en cultivo. Así, se ha observado que ciertas harinas vegetales presentan carencias en alguno de los aminoácidos esenciales, hecho que puede conducir a la aparición de desequilibrios en los peces que las consumen, ocasionando una disminución en su crecimiento, un aumento en su predisposición a las enfermedades y un mayor nivel de descarga de nitrógeno al medio (García-Díez, 2002).

Recientemente se ha demostrado la enorme importancia de los aminoácidos esenciales en las dietas (Conceição *et al.*, 2007). Mientras que la lisina es necesaria para la construcción de todas las proteínas del organismo, tanto la arginina como la glutamina, han sido descritos como moduladores de la inmunidad celular (Roth, 2007), siendo conocida su actuación en el pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Buentello y Gatlin, 2001) y en la trucha arcoíris (Ganassin *et al.*, 1998). Además, la glutamina es la

principal fuente de energía del epitelio del tracto intestinal (Sundh *et al.*, 2010). Por lo que es necesaria tanto para el adecuado funcionamiento del digestivo como para la síntesis y expresión de IgA a nivel del lumen intestinal. Esta se ha descrito como moduladora de la microbiota intestinal, promoviendo la resistencia frente a patógenos y la curación de las mucosas dañadas (Flajnik, 2010). Decir también que Richard *et al.* (2010) han demostrado recientemente el efecto regulador ejercido por ciertos aminoácidos en el hígado del lenguado senegalés, sobre la expresión de distintos enzimas implicados en el metabolismo de los aminoácidos y carbohidratos y en los procesos de envejecimiento celular.

En los últimos años se han comenzado a añadir concentrados proteicos de soja en piensos de engorde y también en los diseñados para el desarrollo de postlarvas de lenguado senegalés. Así, Aragao *et al.* (2003a) sustituyeron proteína de origen marino por concentrado de proteína de soja sin añadir ningún aminoácido esencial. Dichos investigadores no observaron una disminución en el crecimiento de los ejemplares pero sí cambios en el metabolismo de los aminoácidos y en la síntesis lipídica que deberían estudiarse con más profundidad.

Los piensos de engorde de lenguado senegalés han ido evolucionando desde un nivel elevado de grasa (22%) hasta el actual 15% (Skretting, 2005). Esto ha ayudado a los procesos de absorción y digestión en el intestino y han generado juveniles con una mejor condición del hígado y por tanto más saludables. En esta formulación dietética más específica ha habido una disminución paralela del aporte de aceite de pescado en el pienso, desde el inicial 15% al actual 7,5% (Skretting, 2005). La inclusión de aceites vegetales sustitutivos en las dietas se ha demostrado que produce un aumento en la cantidad de vacuolas grasas en el hígado y los enterocitos (Olsen *et al.*, 2003; Morais *et al.*, 2005), tanto con proporciones de sustitución del 75% (Francis *et al.*, 2007), como cuando son bajas y además se acompañan de un inadecuado balance de aminoácidos (Caballero *et al.*, 2003; Menoyo *et al.*, 2004).

Además cada vez se está teniendo más en cuenta la importancia de una buena formulación del perfil de ácidos grasos, sobre todo en lo concerniente al DHA y al EPA, dada la repercusión que éstos tienen en el desarrollo y bienestar de los ejemplares. Si bien se han estudiado los requerimientos de lípidos y ácidos grasos esenciales en las primeras etapas de desarrollo de lenguado senegalés (Villalta *et al.*, 2005; Villalta, 2007; Villalta *et al.*, 2008) no se ha realizado una investigación para la etapa de engorde. Estos últimos autores determinaron en sus trabajos las cantidades óptimas de los ácidos grasos ARA, EPA y DHA para lograr el mejor crecimiento, supervivencia y pigmentación en las primeras etapas de vida del lenguado senegalés. Así mismo dichos investigadores determinaron el efecto de dichos ácidos grasos sobre la composición corporal de las larvas y recalcaron la importancia que tiene la relación ARA/EPA para la producción de prostaglandinas y la pigmentación en *S.senegalensis*. Paralelamente Morais *et al.* (2004; 2006a) estudiaron en esta misma especie el efecto del enriquecimiento de la artemia con distintos niveles y fuentes de lípidos sobre el crecimiento, la supervivencia, el metabolismo lipídico y la capacidad digestiva. Más recientemente, Dámaso-Rodríguez *et al.* (2010) han observado como una alimentación deficitaria en ácidos grasos esenciales durante las primeras etapas de vida tiene un efecto negativo sobre el crecimiento posterior de los juveniles de lenguado senegalés.

Respecto a la adición de micronutrientes en las dietas comerciales se sabe que junto con los macronutrientes incrementan la resistencia de los peces frente a patógenos como virus, bacterias, parásitos y hongos. Numerosas investigaciones relacionan la incorporación al pienso de factores dietéticos como pueden ser los aminoácidos, los nucleótidos, los ácidos grasos esenciales, los minerales y las vitaminas con una adecuada respuesta inmune y salud final en los ejemplares en cultivo (Lall, 2000; Verlhac y Kiron, 2004; Trichet, 2010).

La adición de aminoácidos esenciales en las dietas con sustitución de harinas de pescado por harinas vegetales es fundamental para mantener el bienestar de lenguado senegalés en cultivo (Valente *et al.*, 2010a). Asimismo, el suplemento de las dietas con ciertos aminoácidos puede ser beneficioso para esta especie en las etapas larvaria y posteriores ante condiciones de estrés, como pudieran ser el traslado de los ejemplares, cambios en la salinidad del agua ó el aumento de temperaturas (Aragao *et al.*, 2008).

Los nucleótidos ya se están incorporando en las dietas comerciales empleadas para lenguado senegalés y para otras especies, fundamentalmente en las primeras etapas de desarrollo ó como prevención de estrés de manejo (transporte, clasificación por tamaños, etc.) y enfermedad. (Skretting, 2005). Generalmente los nucleótidos añadidos proceden del DNA de bacterias ó de levaduras y algunos presentan capacidad inmunoestimulante, aunque sus mecanismos de acción difieren de la característica de los β -glucanos. Otros nucleótidos actúan como unidades básicas para la síntesis del DNA y RNA necesarios para la división y multiplicación celular. El papel de los nucleótidos se ha demostrado en teleósteos en la mayor resistencia a enfermedades, tolerancia al estrés, eficiencia de vacunación, crecimiento y respuesta inmune (Burrells *et al.*, 2001). Así, se ha descrito su papel en la modulación de la respuesta inmune innata y específica en diferentes especies de peces (Li y Gatlin, 2006), mediante la activación de la expresión de genes relacionados con ésta (Low *et al.*, 2003). Asimismo se ha relacionado su aporte en dieta con el mejor funcionamiento digestivo, sobre todo a nivel de las microvellosidades, ya que favorecen la absorción intestinal (ej. del hierro), y modulan el metabolismo de los ácidos grasos. En este sentido, actualmente se comercializa un producto comercial (Patogard®), formado por extractos de levadura con proteínas ricas en manosa, que protege frente a la infecciones bacterianas del digestivo interfiriendo la unión entre los patógenos y los receptores de la mucosa digestiva.

Otras sustancias que están siendo añadidas en las dietas para peces ya que mejoran la salud intestinal de los ejemplares en cultivo son los ácidos orgánicos y ácidos grasos de cadena corta procedentes de extractos vegetales como pueden ser el aceite de *Echium* (Villalta *et al.*, 2008; Díaz-López *et al.*, 2009; Díaz-López *et al.*, 2010), el membrillo de Bengala (Pratheepa y Sukumaran, 2010) ó el té blanco (Peres *et al.*, 2010). Se ha demostrado que los extractos vegetales, añadidos en pequeñas concentraciones al alimento, mejoran el pH, proporcionan energía al enterocito, apoyan la diferenciación celular y la arquitectura intestinal. Además algunos de estos ácidos son ya producidos de forma natural por la microbiota intestinal por lo que su adición en dieta ejercería un efecto añadido. Esto último está siendo el objeto de diferentes investigaciones en la actualidad (Skretting, 2005).

Respecto a la incorporación de vitaminas y minerales en la dieta en el lenguado senegalés, en la etapa larvaria se ha estudiado el efecto beneficioso de la vitamina A

sobre el crecimiento, desarrollo del esqueleto y la calidad larvaria (Fernández *et al.*, 2009). También se ha observado en las primeras etapas de cultivo como el enriquecimiento de la dieta con vitamina K activa la expresión de las proteínas implicadas en el desarrollo y mantenimiento del esqueleto en el lenguado senegalés (Richard *et al.*, 2008).

A pesar de la importancia para el desarrollo de sus funciones vitales no existen datos en la actualidad sobre las necesidades de vitaminas, minerales y oligoelementos en las distintas etapas de cultivo del lenguado senegalés. Sin embargo, es bien conocida la actuación sinérgica de algunos micronutrientes como son el Selenio y la Vitamina C con los β -1,3 y β -1,6 glucanos. Dichos micronutrientes aumentan la capacidad antimicrobiana de los leucocitos en situaciones de infección, mediante la activación del enzima glutatión-peroxidasa (Se) y el aumento de la concentración de glutatión (Vitamina C) en los macrófagos y linfocitos, como consecuencia del incremento del estrés oxidativo asociado a dichos episodios (Lim y Webster, 2001; Nayak *et al.*, 2007). El poder protector de la vitamina A y algunos carotenoides como la luteína, xantofila, β -caroteno, licopeno, etc., frente al daño celular está asociado a su unión con radicales de oxígeno, permitiendo el mantenimiento de las estructuras además de la prevención de infecciones a nivel de las membranas mucosas. La vitamina E además de presentar capacidad inmunoestimulante, especialmente indicado en ejemplares de mayor edad, se caracteriza por ser el principal agente antioxidante de los ácidos grasos poliinsaturados (Lall y Lewis-McCrea, 2007). Este último carácter hace fundamental su incorporación en las dietas de este micronutriente, así como de la vitamina C que además de actuar como cofactor en una gran cantidad de reacciones enzimáticas está implicada en la regeneración de la Vitamina E. Respecto a los minerales, decir que el zinc es un cofactor de varias enzimas que apoyan funciones inmunes (Lall, 2000) y junto con el manganeso y el cobre están implicados en el crecimiento y desarrollo del tejido óseo en los peces (Lall y Lewis-McCrea, 2007). También el calcio y el fósforo además de estar involucrados en diferentes funciones como es la del movimiento (calcio) y la producción y acumulación de energía (fósforo) están estrechamente relacionados con el desarrollo y mantenimiento del esqueleto (Lall y Lewis-McCrea, 2007).

Otros de los agentes que se están incorporando a las dietas para mejorar la calidad de los peces en cultivo en términos de rendimiento dietético y protección frente a enfermedades son los probióticos y que son el objetivo de esta tesis y merecen, por tanto, una sección específica.

4.3. Apoyo de las defensas naturales

Tanto el tracto digestivo como las branquias y el cuerpo de los peces están cubiertos de mucus, lo que relaciona estas superficies mucosas tanto con las vías de entrada de los patógenos como con la respuesta inmune. Los peces que carecen de escamas, a menudo producen una cantidad mayor de mucus. Dicho mucus está compuesto por multitud de sustancias, como proteasas, lisozima, citoquinas, etc, cuya función es la de proteger al individuo frente a la acción de agentes extraños. De esta manera, 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.

Algunos autores sugieren que en los peces el sistema inmune de las mucosas es relativamente independiente del global, a diferencia de lo observado en mamíferos, pero otros describen la existencia de una estrecha relación entre ambos (Lin *et al.*, 2000).

Los peces tienen la capacidad de responder a ciertos microorganismos ó sustancias que les son extrañas (antígenos) con respuestas inmediatas no específicas (innatas), así como con respuestas adaptativas ó específicas, que conllevan un proceso de reconocimiento y memoria. En todos los vertebrados ambos tipos de respuesta inmune implican componentes celulares y humorales que trabajan conjuntamente para marcar y eliminar 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 implicadas en la inmunidad innata a menudo reconocen estructuras moleculares comunes en patógenos o determinados productos que éstos liberan mediante receptores de superficie celulares (Magnadottir, 2006), actuando de inmediato o tras un periodo corto de encuentro con el antígeno (Watts *et al.*, 2001). Dichas células incluyen macrófagos, neutrófilos y otros granulocitos. (Do Vale *et al.*, 2002) y células citotóxicas no específicas. Los patógenos bacterianos encontrados son fagocitados, digeridos y destruidos en el interior celular a través del estallido respiratorio (Secombes, 1996) ó bien mediante proteasas, lipasas, fosfatasas u otras sustancias con propiedades antimicrobianas (Neumann *et al.*, 2001). Además, los macrófagos producen lisozimas, que pueden ser estimuladas por lipopolisacáridos bacterianos ó B-glucanos procedentes de levaduras (Paulsen *et al.*, 2001).

Se han identificado muchos factores humorales asociados a la respuesta inmune innata en peces, como el complemento, el interferón, la transferrina, las lectinas y las lisozimas (Secombes, 1996). Las interacciones y activaciones en cascada de las numerosas proteínas asociadas al complemento son importantes, tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa. La transferrina es una glicoproteína sanguínea que liga hierro, inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y el daño celular (Ellis, 1999).

La respuesta inmune adaptativa implica componentes celulares y humorales y se dirige a antígenos específicos, conservando una memoria. A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, donde la respuesta innata colabora en la activación de la respuesta adaptativa, permitiendo la actuación conjunta frente a patógenos (Watts *et al.*, 2001), en los peces la respuesta adaptativa puede llevar más de 15 días en manifestarse (Kollner y Kotterba, 2002). Un buen número de células y componentes intervienen como linfocitos B, neutrófilos y macrófagos, proteínas de membrana receptoras de linfocitos T, inmunoglobulinas y sistema del complemento. Existen numerosos factores humorales implicados en la activación de componentes clave en esta respuesta como son las citokinas. Sin embargo, el factor humoral más importante en la respuesta adaptativa son las inmunoglobulinas (Ig) producidas por los linfocitos B. En teleósteos el principal anticuerpo es la IgM, producida en el suero (Bengtén *et al.*, 2000), aunque también se encuentran otras inmunoglobulinas. Así, se han observado genes que codifican IgD en lenguado japonés (Hirono *et al.*, 2003).

La homeostasis de un organismo implica una compleja trama de hormonas y citoquinas con una comunicación bidireccional desde el sistema inmune al

neuroendocrino y viceversa. El apoyo a este proceso, que de modo natural regula la salud y bienestar de los peces, es una estrategia de gran interés en el cultivo intensivo de los ejemplares, donde las condiciones de estabulación, alimentación, manejo, etc., producen estrés sobre los mismos. En la actualidad, dicho apoyo se está llevando a cabo, tanto mediante la mejora de las dietas y de las condiciones de cultivo de los peces, como mediante la selección genética de los ejemplares mejor dotados.

5. Los probióticos en acuicultura

5.1 Probióticos: características y modos de actuación

En los últimos cincuenta años, el término probiótico ha ido modificándose de manera paralela al desarrollo de la microbiología moderna.

A comienzos de los años 50, Vergio (1954) fue uno de los primeros científicos en establecer una definición de probiótico al comparar los efectos adversos (“*antibiotika*”) que los antibióticos ejercían sobre la microbiota intestinal, con las acciones beneficiosas (“*probiotika*”) promovidas por otros factores que no pudo determinar. Treinta y cinco años más tarde Fuller (1989) popularizó el término y estableció además una asociación estrecha entre probiótico y alimento, definiéndolo como “producto alimenticio vivo que afecta beneficiosamente al hospedador mejorando su equilibrio microbiano intestinal”.

Es a finales de la década de los 90, cuando dentro de la definición de probiótico, además de la asociación con el alimento, se incorpora la asociación con un microorganismo vivo. De este modo en el año 1997, Tannock (1997) define a los probióticos como “aquellas células microbianas vivas que son administradas como suplementos dietéticos con el objetivo de mejorar la salud”. Y la FAO en 1999, dado el creciente interés mundial en el empleo de probióticos para alimentación humana, por primera vez define el término conforme a Naidu *et al.* (1999) como: “todo complemento microbiano en la dieta que afecta beneficiosamente a la fisiología del hospedador mediante la modulación de la inmunidad sistémica y mucosa, además de mejorar el balance microbiano mediante la prevención de la colonización gastrointestinal por bacterias no deseables”. De esta definición se deduce que los efectos probióticos no están sólo restringidos al ámbito intestinal, sino que afectan a todo el organismo (<http://www.who.int/foodsafety>).

También es a finales de los 90 cuando Salminen *et al.* (1999), realizando un trabajo de revisión, concretan un poco más la definición de probiótico no restringiéndola a la necesidad de su viabilidad. Dichos investigadores establecieron que “todo probiótico es cualquier preparación microbiana (no necesariamente viva) ó formada por componentes de células microbianas, que ejerza un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador”. Dos años más tarde Schrezenmeir y de Vrese (2001) fueron más precisos en la definición del término al incorporar en la misma la posibilidad de cuantificación, al describirlo como “toda preparación ó producto que contiene microorganismos definidos en número suficiente, capaces de alterar la microbiota por implantación ó por colonización de un compartimento del hospedador mediante la que ejercen efectos beneficiosos sobre la salud del hospedador”. Esta última

definición fue más delimitada en cuanto a la cuantificación por la OMS en el año 2001 estableciendo que “todo probiótico es un organismo vivo que ingerido en una dosis definida ejerce efectos beneficiosos sobre su salud”.

Existen numerosos trabajos que avalan los efectos beneficiosos de los probióticos en el hombre: modulando el sistema inmunitario (Blum y Schiffrin, 2001), reduciendo el colesterol y la hipertensión, protegiendo frente a enfermedades infecciosas, inflamatorias, alérgicas y tumorales (Gill, 2003). Los géneros bacterianos *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* son ampliamente utilizados en gran cantidad de productos lácteos fermentados, (yogurt, queso, nata, etc..) destinados a consumo humano (Fuller, 1987). Su uso también se está aplicando en las explotaciones ganaderas (Fulton *et al.*, 2002; Khuntia y Chaudhary, 2002).

La microbiota intestinal en los animales acuáticos es muy diferente a la de los terrestres, Esto es debido a que la microbiota está en interacción constante con el ambiente que le rodea, por lo que existe una gran influencia del medio sobre la misma y finalmente sobre la salud de los ejemplares en cultivo (Gatesoupe, 2005). De éste modo, Spanggaard *et al.* (2000) estudiando la evolución de la microbiota de la trucha arcoiris en cultivo, encontraron una variación sustancial a lo largo del tiempo, hasta con fluctuaciones diarias, lo que indica que la mayoría de los microorganismos procedentes del agua y del alimento, están en tránsito dentro del intestino de los ejemplares. Esta circunstancia ha llevado a modificar el concepto de probiótico dentro del campo de la acuicultura.

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.* (2010a) 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 (Olsson *et al.*, 1992; Nikoskelainen *et al.*, 2001; Chabrállón, 2004; Vine *et al.*, 2004a; Vine *et al.*, 2004b; Chabrállón *et al.*, 2006; Ringo *et al.*, 2010), la estimulación de la respuesta inmune

(Irianto y Austin, 2003; Salinas *et al.*, 2005; Balcázar *et al.*, 2006), la mejora del estado nutritivo del huésped mediante el aporte de enzimas, aminoácidos esenciales, péptidos, ácidos grasos, vitaminas, minerales, etc (Sugita *et al.*, 1996; de Moura *et al.*, 2009) y la inhibición de la expresión de genes de virulencia ó ruptura del “quorum sensing” (Defoirdt *et al.*, 2007).

5.2. Probióticos ensayados en acuicultura

Las primeras investigaciones realizadas sobre la aplicación de probióticos en el campo de la acuicultura estuvieron basadas en los buenos resultados obtenidos con anterioridad tanto en el campo de la ganadería como en el de la medicina humana (Sakai, 1999). En dichos trabajos se estudió la influencia de la aplicación de probióticos sobre la fisiología, la nutrición y el metabolismo del huésped, al mismo tiempo que se trataba de determinar su posible papel protector frente a patógenos y oportunistas. (Gatesoupe, 1982; Kozasa y Wolter, 1986; Landolt, 1989; Matty, 1989; Robin, 1989). Es a finales de la década de los 80 cuando a partir de estos buenos resultados iniciales, el Grupo de Trabajo de Cultivo de Peces del “Consejo para la Exploración del Mar del Atlántico” (ICES) propuso en 1989 avanzar en ésta línea, dado el alcance que podría llegar a tener la aplicación de probióticos en la acuicultura. Desde este momento comienza a crecer el número de investigaciones sobre el empleo de probióticos en el cultivo de diferentes especies como son el rodaballo (Gatesoupe, 1991; García de la Banda *et al.*, 1992; Munro *et al.*, 1994), la trucha arcoíris (Olsson *et al.*, 1992; Gram *et al.*, 1999), el salmón (Austin *et al.*, 1995), el bacalao (Gildberg y Mikkelsen, 1998) y el pez gato (Bly *et al.*, 1997). Destacan especialmente los trabajos de revisión realizados por Ringo y Gatesoupe (1998), Gatesoupe (1999), Irianto *et al.* (2002) y Verschueren *et al.* (2000).

Uno de los criterios más empleados para la selección de potenciales probióticos en acuicultura es su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas de peces (Austin *et al.*, 1995; Gatesoupe, 1999; Gram *et al.*, 1999). Desde que Rosenfeld y Zobell (1947) describieran la existencia de bacterias marinas productoras de antibióticos y el mar como reservorio de antagonistas, varios autores han estudiado la microbiota asociada a los peces, encontrando bacterias con esta capacidad pertenecientes a diversos géneros: *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium* y *Streptococcus*. A continuación se presentan los probióticos más estudiados en

Tabla 3. Aplicaciones de probióticos en acuicultura de peces

Probiótico	Parámetros	Referencias
<i>Anguilla anguilla</i>		
<i>B. toyoi</i>	MI, R, V	Chang <i>et al.</i> (2002)
<i>E. faecium</i> SF68		
<i>Carassius auratus</i>		
<i>La. lactis</i>	R	Sugita <i>et al.</i> (2009)
<i>Catla catla</i>		
Efino®	S	Raj <i>et al.</i> (2008)
<i>Cyprinus carpio</i>		
<i>Streptococcus faecium</i>	MI, N	Bogut <i>et al.</i> (1998)

Tabla 3 (cont.)

Probiótico	Parámetros	Referencias
<i>Dicentrarchus labrax</i>		
<i>L. delbrueckii delbrueckii</i>	CR, ES, I	Carnevali <i>et al.</i> (2006)
<i>Lates calcarifer</i>		
<i>Lactobacillus sp.</i>	CC, CR, I, R	Rengpipat <i>et al.</i> (2008)
<i>Epinephelus coioides</i>		
<i>L. plantarum</i>	I, R	Son <i>et al.</i> (2009)
<i>Gadus morhua</i>		
<i>C. divergens</i>	MI, R	Gildberg <i>et al.</i> (1998)
<i>C. maltaromaticum</i>	H, MI	Ringo <i>et al.</i> (2010)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>		
<i>La. lactis, Leu. Mesenteroides, L. sakei</i>	R, I, MI	Balcázar <i>et al.</i> (2007) ^a
<i>Leu. mesenteroides, L. plantarum</i>	R, MI, CR	Vendrell <i>et al.</i> (2008) ^a
<i>L. rhamnosus</i>	R, CR	Nikoskelainen <i>et al.</i> (2001) ^a
<i>L. rhamnosus</i>	MI, I	Nikoskelainen <i>et al.</i> (2003) ^a
<i>L. rhamnosus</i>	MI, I	Panigrahi <i>et al.</i> (2004) ^a
<i>L. rhamnosus</i>	MI, I	Panigrahi <i>et al.</i> (2005) ^a
<i>L. rhamnosus, B. subtilis, E. faecium</i>	I	Panigrahi <i>et al.</i> (2007) ^{a,b}
<i>E. faecalis</i>	CC, CR, I, R	Rodriguez-Estrada <i>et al.</i> (2009) ^a
<i>B. subtilis</i>	R, MI, I	Newaj-Fyzul <i>et al.</i> (2007)
<i>B. subtilis+B. licheniformis</i>	R, I	Raida <i>et al.</i> (2003) ^a
<i>B. subtilis+B. licheniformis</i>	CC, N, MI, CR	Bagerhi <i>et al.</i> (2008) ^a
<i>B. subtilis+B. licheniformis, E. faecium</i>	CC, N, MI, CR, I	Merrifield <i>et al.</i> (2009) ^a
<i>B. subtilis+B. licheniformis, E. faecium,</i> <i>P. acidilactici</i>	H, MI	Merrifield <i>et al.</i> (2010b) ^a
<i>Bacillus spp., A. sobria</i>	R, I	Brunt <i>et al.</i> (2007) ^a
<i>Bacillus spp., A. sobria</i>	I	Brunt <i>et al.</i> (2008) ^a
<i>Enterobacter cloacae, B. mojavensis</i>	R, I	Capkin and Altinok (2009) ^a
<i>P. acidilactici</i>	CC, N, MI, CR, I	Merrifield <i>et al.</i> (2011) ^a
<i>P. acidilactici, Sa. cerevisiae</i>	CC, N, MI, CR, ME	Aubin <i>et al.</i> (2005) ^a
<i>P. acidilactici, Sa. cerevisiae</i>	R, I	Quentel <i>et al.</i> (2004) ^a
<i>C. divergens, C. maltaromaticum</i>	I	Kim and Austin (2006; 2006) ^a
<i>C. inhibensa</i>	R, MI	Robertson <i>et al.</i> (2000) ^a
<i>A. sobria</i>	R, I	Brunt and Austin (2005) ^{a,b}
<i>A. sobria, Brochothrix thermosphacta</i>	R, I	Pieters <i>et al.</i> (2008) ^a
<i>A. sobria</i>	R, I	Arijo <i>et al.</i> (2008) ^{a,b}
<i>A. hydrophila, V. fluvialis,</i> <i>Carnobacterium spp.,</i> <i>C. inhibens, V. alginolyticus</i> and an unidentified Gram-positive coccus A1-6	R, I, MI	Irianto and Austin (2002) ^a
<i>V. fluvialis</i> A3-47S		
<i>A. hydrophila</i> A3-51	R, I	Irianto and Austin (2003) ^a
<i>Carnobacterium</i> BA-211 and unidentified Gram-positive coccus		
<i>Ps. fluorescens, Pseudomonas</i> strains, <i>Carnobacterium</i> strains	R	Spanggaard <i>et al.</i> (2001) ^{a,b}
<i>Ps. fluorescens</i>	R,	Gram <i>et al.</i> (1999) ^{a,b}
<i>Sa. cerevisiae, D. hansenii, R. glutinis</i>	MI	Andlid <i>et al.</i> (1995) ^a
<i>Sa. cerevisiae a</i>	EN, MI	Waché <i>et al.</i> (2006) ^a
Kocuria SM1	R, I	Sharifuzzaman and Austin (2009) ^a

Tabla 3 (cont.)

Probiótico	Parámetros	Referencias
Oreochromis niloticus		
<i>B. pumilus</i> (Organic Green®)	CC, R, CR, I	Aly <i>et al.</i> (2008b)
<i>B. pumilus</i> , <i>B. firmus</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.	R, V	Aly <i>et al.</i> (2008a)
Alchem poseidon®	I, R	Taoka <i>et al.</i> (2006)
Poecilia reticulata, Poecilia sphenops, Xiphophorus helleri Xiphophorus maculatus		
<i>B. subtilis</i>	CC, CR, EN, MI, R	Ghost <i>et al.</i> (2007)
Psetta maxima		
<i>V. pelagius</i>	MI, S	Ringo <i>et al.</i> (2008)
<i>L. plantarum</i>	R	Gatesoupe, (1994)
<i>Carnobacterium</i> sp.		
Salmo trutta		
<i>La. lactis</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>L. sakei</i>	I, MI	Balcázar <i>et al.</i> (2007) ^a
<i>La. lactis</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> ,	R, I	Balcázar <i>et al.</i> (2009) ^a
Salmo salar		
<i>C. inhibensa</i>	R	Robertson <i>et al.</i> (2000) ^a
<i>C. divergens</i>	R, MI, CR	Gildberg <i>et al.</i> (1995) ^a
<i>L. delbrueckii</i>	GH, R, MI	Salinas <i>et al.</i> (2008) ^a
<i>C. divergens</i>	GH, R, MI	Ringø <i>et al.</i> (2007) ^b
<i>Ps. fluorescens</i>	R	Gram <i>et al.</i> (2001) ^{a,b}
<i>Ps. fluorescens</i>	R	Smith and Davey (1993) ^a
<i>V. alginolyticus</i>	R	Austin <i>et al.</i> (1995) ^{a,b}
Salvelinus alpinus		
<i>Carnobacterium</i> spp, <i>L. plantarum</i> , <i>Streptococcus</i> sp., <i>Leu. mesenteroides</i>	MI, N	Ringo <i>et al.</i> (1998)
Silurus glanis		
<i>E. faecium</i> M74	MI, N	Bogut <i>et al.</i> (2000)
Solea senegalensis		
<i>S. putrefaciens</i> , <i>S. baltica</i>	CR, I, R	Díaz-Rosales <i>et al.</i> (2009)
<i>S. putrefaciens</i> , <i>S. baltica</i>	CR, EN, H, N, R	Sáenz de Rodríguez <i>et al.</i> (2009)
<i>Vibrio</i> sp. 2J18	CR, MI, S	Makridis <i>et al.</i> (2008)
Gram + J84 y <i>Shewanella</i> sp. 2J27	MI	Tapia-Paniagua <i>et al.</i> (2010) ^b
<i>S. putrefaciens</i> , <i>S. baltica</i>	CC, CR, H, MI, N, R	García de la Banda <i>et al.</i> (2010)
Sparus aurata		
<i>Cytophaga</i> sp. <i>Roseobacter</i> sp., <i>Ruegeria</i> sp., <i>Paracoccus</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp. <i>Shewanella</i> sp.	S	Makridis <i>et al.</i> (2005)
<i>L. fructivorans</i> , <i>L. plantarum</i> ,	H, I, S	Picchietti <i>et al.</i> (2007)
<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i> , <i>B. subtilis</i>	H, I	Salinas <i>et al.</i> (2008)
<i>S. putrefaciens</i>	CR, E, I, MT	Varela (2010)
<i>S. putrefaciens</i> , Pdp5, Pdp9, 51M6	R	Chabrilón <i>et al.</i> (2006)

Abreviaturas: CC Composición corporal, EN Enzimas, R Resistencia frente a patógenos, N Nutrición, H Histología, MI Microbiota, MT Metabolismo, CR Crecimiento, I Inmunología y Hematología, ME Malformaciones esqueléticas, V Viabilidad, S Supervivencia, ES Estrés.

Abreviaturas taxonómicas. A. = Aeromonas, B. = Bacillus, C. = Carnobacterium, D. = Debaryomyces, E. = Enterococcus, L. = Lactobacillus, La. = Lactococcus, Leu. = Leuconostoc, P. = Pediococcus, Ps. = Pseudomonas, R = Rhodotorula, Sa. = Saccharomyces, S. = Shewanella, V. = Vibrio.

a Estudios 'in vivo'; b Estudios 'in vitro'; c Experimentos de campo

se encuentran las bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, etc) (Tabla 3). En los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas de caracterización microbiológica, como la electroforesis en gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE) que analiza el 16S rDNA, permitiendo una visión más completa de la microbiota en estudio (Brunvold *et al.*, 2007; Fjellheim *et al.*, 2007; Tapia-Paniagua *et al.*, 2010a; Vadstein *et al.*, 2010). Dicha caracterización microbiológica, en el caso de los ejemplares sanos, abre la posibilidad, de aislamiento de diferentes especies bacterianas con fines probióticos (Bordas *et al.*, 2003; Ringo *et al.*, 2008; Daniels *et al.*; Ferguson *et al.*). Los probióticos seleccionados primeramente son ensayados *in vitro* en el laboratorio respecto a su capacidad de inhibición frente a patógenos, adhesión al mucus, resistencia a la bilis, etc. y posteriormente *in vivo* (Skjermo y Vadstein, 1999; Gatesoupe, 2000; Makridis *et al.*, 2000; Verschueren *et al.*, 2000; Huys *et al.*, 2001). Su aplicación se puede realizar directamente en el medio de cultivo (Austin *et al.*, 1995; Moriarty, 1999; Ringo y Birbeck, 1999), ó mediante bioencapsulación en el alimento vivo (rotífero y Artemia) durante las etapas larvaria y postlarvaria (Gatesoupe, 1991; Gómez-Gil *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 2000; Makridis *et al.*, 2008; García de la Banda *et al.*, 2008, 2009; Lobo *et al.*, 2009, 2010) ó incorporados en el pienso durante las etapas de destete y engorde (Rodríguez *et al.*, 2009; García de la Banda *et al.*, 2010).

Se ha observado que los probióticos ensayados “*in vitro*” son capaces de producir una mejora en la histología de los enterocitos de salmón (Ringo *et al.*, 2007a, 2010; Salinas *et al.*, 2008a), implementando los procesos de absorción y de eficiencia digestiva. La administración *in vivo* incorporado en la dieta modifica el intestino proximal de la trucha arcoiris, presentando microvellosidades más alargadas (Merrifield *et al.*, 2010e), como también se observa en dorada (Pichiatti *et al.*, 2007). Dado que en los peces, la microbiota intestinal es una de las primeras barreras defensivas contra infecciones (Ringo y Olsen, 2008; Ringo *et al.*, 2010b) una de las áreas de investigación de creciente interés en acuicultura está siendo la aplicación de probióticos. Se ha demostrado que la microbiota intestinal está implicada en la regulación de la expresión de numerosos genes en el tracto digestivo que están involucrados tanto en el control de la proliferación del epitelio, como en el metabolismo de los nutrientes y en la respuesta inmune innata (Rawls *et al.*, 2004). Al igual que en el caso del hombre, se ha observado como la administración de probióticos produce una modulación en la composición de la microbiota intestinal de los peces. (Garrido *et al.*, 2005; Gómez y Balcázar, (2008) Tanto dicha modulación de la microbiota, como la mejora de la histología del tracto digestivo descrita en el párrafo anterior, pueden contribuir a una mejor nutrición del huésped (Merrifield *et al.*, 2010a). También en los trabajos de Butts *et al.*, 1999 y de Waché *et al.*, (2006e) y Tovar-Ramírez *et al.* (2004) con trucha arcoiris se observa como los probióticos intervienen en la activación enzimática y en la maduración intestinal. De este modo, dichos aditivos contribuirían a una mayor digestibilidad y aprovechamiento nutritivo de la dieta (Lin *et al.*, 2004). Algunos autores han descrito incrementos en las tasas de crecimiento e índices de conversión (Wang *et al.*, 2008) y otros incluso han demostrado la relación existente entre la aplicación de probióticos y la adición extra de minerales en dieta con la disminución de la tasa de malformaciones esqueléticas (Merrifield *et al.*, 2010a).

Asímismo se ha observado como la adición probiótica en dieta estimula el sistema inmune innato y adquirido de los peces (Nikoskelainen *et al.*, 2001, 2003; Balcázar *et*

al., 2006b; Kim y Austin, 2006; Panigrahi *et al.*, 2007; Brunt *et al.*, 2008, Pieters *et al.*, 2008; Merrifield *et al.*, 2010b, c). Por esta razón, su aplicación en la etapa larvaria, donde el sistema inmune está menos desarrollado, está siendo objeto de estudio. Además en el cultivo de peces, es en estas primeras etapas de vida cuando se llevan a cabo manipulaciones periódicas asociadas a los procesos de clasificación por tamaños y transporte de unas instalaciones acuícolas a otras, aumentando el estrés (Cnaani *et al.*, 2004; Fast *et al.*, 2006) y la susceptibilidad a infecciones (Arockia Raj *et al.*, 2008). Respecto a la respuesta frente al estrés se ha demostrado como *Lactobacillus delbrueckii delbrueckii* mejora el crecimiento y reduce los niveles de cortisol en lubina (Carnevalli *et al.*, 2006). Mientras que *Lactobacillus fructivorans* y *Lactobacillus plantarum* evitan niveles altos de colesterol en juveniles de dorada sometidos a estrés agudo (Rollo *et al.*, 2006). Asimismo Varela *et al.*, (2010) han demostrado que la adición de *S.putrefaciens* en dieta mejora el crecimiento y la resistencia frente al estrés en doradas cultivadas en condiciones de alta densidad.

Por todo ello y dado el creciente interés de promover un adecuado estado fisiológico de los ejemplares en cultivo, los estudios sobre el empleo de probióticos en acuicultura marina han experimentado un incremento enorme en los últimos 25 años. Dicho incremento ha ido paralelo al de la aplicación de probióticos en otros ámbitos (Fig. 10). Así a mediados de los años 90 el número de investigaciones sobre probióticos en acuicultura era de 2-3 al año, mientras que en la actualidad esta cifra se sitúa ya en 25 publicaciones anuales.

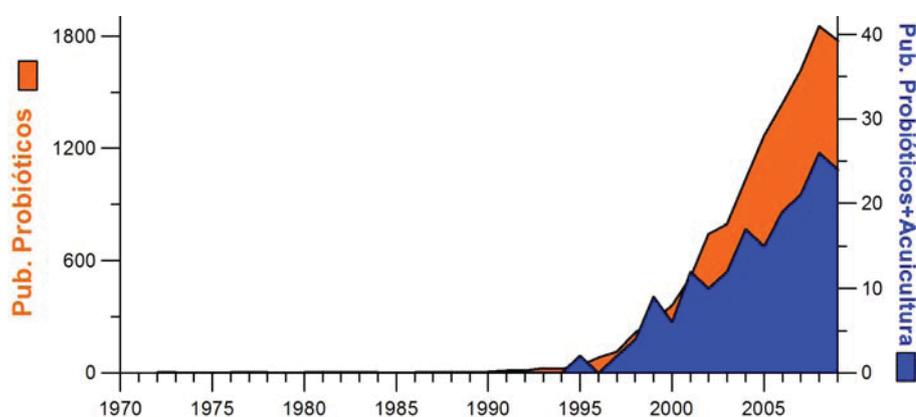


Figura 10. Evolución de publicaciones relacionadas con el empleo de probióticos en acuicultura

Las investigaciones con probióticos en acuicultura tienen en última instancia un enfoque hacia su aplicación a escala industrial. Por esta razón además de necesitar una correcta combinación de nutrientes, una selección de materias primas y un proceso de producción adecuado de los piensos comerciales, precisa establecer unas condiciones zootécnicas de cultivo e higiene que favorezcan el crecimiento saludable de los ejemplares.

5.3. Probióticos en lenguado senegalés

Como ha quedado reflejado en el anterior apartado para llegar a emplear un probiótico en el cultivo industrial de una determinada especie de pez se han de realizar numerosos ensayos previos. Tras una selección inicial “in vitro” como potencial probiótico (inhibición frente a patógenos, alta capacidad de adhesión al mucus intestinal, resistencia a las sales biliares del huésped, etc.), el candidato habrá de demostrar “in vivo” ausencia de patogenicidad y evidencia científica de que ejerce algún efecto beneficioso específico sobre la especie de cultivo estudiada (protección frente a patógenos, estimulación del crecimiento, aumento de la respuesta inmune, etc.). También será necesario probar su supervivencia en el interior del tracto digestivo de los ejemplares y su viabilidad durante periodos prolongados de almacenamiento. Finalmente el probiótico deberá superar todos los pasos tecnológicos previos a su comercialización.

En el caso del uso de probióticos para el cultivo del lenguado senegalés hay que remontarse a los primeros ensayos realizados en Japón con la lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) a comienzos de la anterior década. Así, 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*, patógeno muy virulento que queda remanente en los ejemplares. 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 nuestro país, fue en la Universidad de Málaga (UMA), en donde Chabrilón *et al.* (2004) aislaron por primera vez, a partir de mucus de piel de dorada cultivada en buen estado de salud, varias cepas con efecto antagónico “in vitro” frente a diversos patógenos de lenguado senegalés y dorada. Entre las bacterias aisladas, se encontraron *Shewanella putrefaciens* (Pdp11) y *Shewanella báltica* (Pdp13). Otras especies pertenecientes al mismo género han sido aisladas con posterioridad también a partir de ejemplares de bacalao y de lenguado japonés procedentes del medio natural (Satomi *et al.*, 2006; Satomi *et al.*, 2007), así como de intestino de lenguado senegalés alimentado con presa natural (Makridis *et al.*, 2004; Martín-Antonio *et al.*, 2007). Algunas cepas de éste género también se han propuesto como posibles probióticos para peces en cultivo (Makridis *et al.*, 2005; Makridis *et al.*, 2008; Sáenz de Rodrigañez *et al.*, 2009).

Existen diferentes vías de entrada de un patógeno bacteriano en los peces: piel, branquias y tracto digestivo (Ringo, 2004; Ringo *et al.*, 2007), en donde siempre la adhesión a la mucosa resulta clave (Namba *et al.*, 2007). Por ello, la capacidad de adhesión a la mucosa es uno de los criterios más importantes de selección de probióticos (Vine *et al.*, 2004a; Vine *et al.*, 2004b). En su tesis doctoral en la UMA, Chabrilón (2004) realizó un intenso trabajo preliminar estudiando varias cepas de piel de dorada además de las anteriormente citadas (Pdp11 y Pdp13). Éstas dos cepas seleccionadas no son patógenas para el lenguado senegalés y presentan una alta capacidad de adhesión y crecimiento en el mucus de dorada. Aunque ambas bacterias son capaces de inhibir el crecimiento “in vitro” de la especie *P. damsela* subsp. *piscicida* (Chabrilón *et al.*, 2005), Pdp13 inhibió además al 90% de los patógenos que Chabrilón, (2004) ensayó durante su tesis, mientras que Pdp11 lo hizo frente al 60% de

los mismos. Sin embargo Pdp11 es capaz de inhibir también el crecimiento de algunas cepas virulentas de las especies patógenas para el lenguado senegalés *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. anguillarum* (Chabrilion *et al.*, 2005; Chabrilión *et al.*, 2005; Chabrilión *et al.*, 2006). Los mecanismos de inhibición empleados por Pdp11 y Pdp13 frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi* son de competición y de desplazamiento (Chabrilion *et al.*, 2005; Chabrilión *et al.*, 2005), que son estrategias de antagonismo frente a patógenos descritas en múltiples publicaciones (Hjelm *et al.*, 2004; Makridis *et al.*, 2005). Asimismo ambas cepas son resistentes a la bilis, presentando ligeras diferencias en cuanto a la capacidad de adhesión al mucus (Pdp11 8,8-12,7%; Pdp13 5,8-8,6%).

Estudios posteriores desarrollados en la UMA, han demostrado que la administración en dieta de células de Pdp11 inactivadas por calor, produce un aumento significativo en la capacidad fagocítica de los leucocitos del riñón-cefálico en la dorada (*S. aurata*) (Díaz-Rosales, 2006). Sin embargo, esta misma cepa, inactivada por calor, no promueve “in vitro” un aumento significativo en los parámetros de la respuesta inmune innata, tales como son el contenido de la leucocito peroxidasa y del estallido respiratorio de los leucocitos del riñón cefálico en esta especie (Salinas *et al.*, 2006).

Asimismo, trabajos llevados a cabo con posterioridad en la UMA conjuntamente con la Universidad de Almería (UA), han demostrado que la adición de células liofilizadas de Pdp11 en dieta aumenta significativamente el estallido respiratorio de los fagocitos del riñón cefálico, frente a los de los ejemplares que recibieron dieta control o suplementada con Pdp13 (Díaz-Rosales *et al.*, 2009). Estos resultados parecen interesantes pues Barnes *et al.* (1999) habían detectado con anterioridad una alta susceptibilidad de *P. damsela* subsp. *piscicida* a los radicales generados durante el estallido respiratorio.

También en la UMA, García-Millán *et al.* (2009) demostraron que Pdp11 presenta reacción cruzada frente a anticuerpos específicos sintetizados por especímenes de lenguado senegalés contra *P. damsela* subsp. *piscicida*. Este efecto del probiótico sobre el sistema inmune adaptativo ha sido asimismo descrito por Arijo *et al.* (2008), igualmente del equipo de la UMA, quienes observaron cómo la adición de cepas probióticas vivas daba lugar a la expresión de anticuerpos de reacción cruzada frente a proteínas de membrana (OMPs) y productos extracelulares (ECPs) de *V. harveyi*.

Por otro lado, la administración de Pdp11 y Pdp13 en dieta aumenta la actividad leucin aminopeptidasa en el intestino distal de los ejemplares que recibieron ambas dietas probióticas, frente a los peces alimentados con la dieta control (Sáenz de Rodríguez *et al.*, 2009). Estos resultados muestran una mayor eficiencia de la funcionalidad digestiva. Resultados similares han sido observados por Tovar-Ramírez *et al.* (2002) en lubina y Waché *et al.* (2006) en trucha arco-iris.

También en las instalaciones del Instituto español de Oceanografía (Laboratorio de Santander) trabajando en colaboración con la UMA, se ha observado que la administración de Pdp11 bioencapsulado en rotífero o *Artemia* promueve un mayor crecimiento y calidad a nivel larvario y de destete en lenguado senegalés (Lobo *et al.*, 2010)(García de la Banda *et al.*, 2008, 2009) a la vez que modula la microbiota intestinal (Tapia-Paniagua *et al.*, 2009b).

Los estudios que presento a continuación, y que constituyen esta tesis, suponen un avance en el conocimiento de los efectos que Pdp11 y Pdp13, administrados en dieta, tienen sobre lenguado senegalés en engorde. Se investigan parámetros de crecimiento, metabólicos, histológicos y de composición corporal, influencia en la microbiota digestiva, inmunología y promoción de la resistencia frente a patógenos. Aportan resultados novedosos en cuanto a la influencia de estos microorganismos y además contrastan ambas cepas entre sí. También se comparan dos formas de adición de las mismas, en fresco o liofilizado. Estos estudios son un paso más hacia el objetivo final de seleccionar probióticos para su futuro uso industrial en el cultivo intensivo del lenguado senegalés.

Se enmarcan en la participación que el Instituto Español de Oceanografía (C.O. Santander), tiene dentro de los PN de lenguado, financiados por JACUMAR, mencionados anteriormente.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es el estudio de la influencia de las cepas probióticas *Shewanella putrefaciens* (Pdp11) y *Shewanella baltica* (Pdp13), incorporadas en piensos comerciales, sobre el engorde del lenguado (*Solea senegalensis* Kaup 1858).

Para ello se abordaron los siguientes objetivos parciales:

1. Influencia de la alimentación con probióticos sobre el crecimiento y salud de lenguados cultivados:
 - Crecimiento
 - Composición corporal
 - Condición histológica
 - Parámetros metabólicos
 - Parámetros inmunológicos
2. Efecto protector de los probióticos frente a infecciones experimentales con el patógeno *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.
3. Estudio de la influencia de los probióticos sobre la microbiota intestinal de los peces.
4. Optimización del método utilizado para la incorporación de los probióticos en los piensos y su posterior administración a los peces.
5. Caracterización bioquímica y enzimática de las cepas utilizadas. Ensayos de inhibición “in vitro” frente a patógenos.

Para lograr los objetivos propuestos en este trabajo, a continuación se presentan los distintos ensayos realizados:

Ensayo PROBIO 1. El probiótico Pdp11 fresco se incorporó dentro del pienso y se adicionó a juveniles de *Solea senegalensis* en engorde. Se estudió su efecto sobre el crecimiento, composición corporal y resistencia frente a infección experimental con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Tanto la reducida viabilidad bacteriana obtenida en el pienso como el laborioso método de fabricación fueron implementados en el siguiente ensayo.

Ensayo PROBIO 2. Se ensayó una nueva metodología de fabricación del pienso que incluía alginato cálcico para facilitar la incorporación de las cepas bacterianas al mismo. Se emplearon en este caso Pdp11 y Pdp13 liofilizadas, bacterias próximas taxonómicamente. Se comparó su eficacia frente a los parámetros anteriormente

analizados y además se estudió su influencia a nivel histológico en músculo, hígado e intestino, así como sobre la modulación de la microbiota intestinal ejercida en juveniles de *S. senegalensis* en engorde. La viabilidad bacteriana aún hubo de implementarse en el siguiente ensayo.

Ensayo PROBIO 3. Se utilizaron las cepas Pdp11 y Pdp13 frescas, con incorporación en alginato, para implementar la viabilidad bacteriana en pienso. Se analizaron las características metabólicas y bioquímicas de estas cepas y se llevaron a cabo estudios de inhibición “in vitro” frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* y *Vibrio harveyi*. Asimismo, se incorporaron las cepas probióticas frescas en dieta y se observó su efecto sobre los parámetros anteriormente estudiados, determinándose también parámetros inmunológicos en ejemplares de *S. senegalensis* en engorde.

Ensayo PROBIO 4. En base a los resultados obtenidos en los tres ensayos anteriores, se seleccionó la cepa Pdp11 y se incorporó fresca y liofilizada con alginato cálcico en dieta. Se investigó la reducción del tiempo de adición probiótica sobre la protección frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*. Se contrastó el efecto probiótico sobre el estado fisiológico, histológico e inmunológico de los ejemplares. Asimismo, se estudió la modulación de la microbiota intestinal en los peces durante el suministro probiótico y 30 días después, a fin de conocer si esta modulación estaba asociada a la colonización del intestino. Finalmente, se determinaron las características enzimáticas del probiótico suministrado y el perfil de ácidos grasos de las dietas utilizadas.

MATERIALY MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado, primero se describen las metodologías aplicadas a los microorganismos y a los ejemplares de *Solea senegalensis* en cultivo. En segundo lugar, se presentan los protocolos para la preparación de las dietas probióticas empleadas a lo largo de la tesis. Posteriormente, se describen las metodologías utilizadas en la determinación de los parámetros que se investigan. El apartado concluye con la descripción detallada de los cuatro ensayos experimentales realizados y los análisis específicos llevados a cabo en cada una de ellos.

1.- Microorganismos empleados

Para la realización de todos los ensayos se utilizaron las dos cepas probióticas *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) y *Shewanella baltica* Pdp13 (Pdp13) aisladas a partir de mucus de dorada (*Sparus aurata*) cultivada sana. Dichas cepas fueron seleccionadas por sus especiales características, ya comentadas en la introducción de esta tesis.

Ambas cepas Pdp11 y Pdp13, se cultivaron en tubos con 5 mL de caldo de soja triptona (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) con cloruro sódico hasta conseguir una concentración final del 2% (TSBs) durante 18 horas a 22 °C, en continua agitación. Con el fin de conseguir un crecimiento confluyente de los probióticos, y así obtener una cantidad suficiente para ser incorporados en pienso ó para otros usos, dichos microorganismos fueron cultivados en placas de agar de soja y triptona (Difco TM, Sparks, Estados Unidos) suplementadas con cloruro sódico hasta alcanzar una concentración final del 2% (TSAs). Las placas fueron incubadas a 22°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se prepararon las suspensiones bacterianas adicionando a las placas de TSAs crecidas, un volumen de 1mL de tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4). Se recogieron las células con una espátula estéril. La concentración bacteriana de la suspensión fue determinada por colorimetría a 600 nm mediante el espectrofotómetro Hach DR/2500 (Loveland, Colorado, Estados Unidos).

Para la conservación de los dos probióticos se utilizaron tubos troncocónicos Falcon de 50 mL, en los que eran introducidas las bacterias frescas que iban a ser congeladas a -80°C hasta su posterior uso. Cuando iban a ser utilizadas, las bacterias eran descongeladas a temperatura ambiente y se sembraban con asa de platino por cuadrantes en placas de TSAs (Difco), incubándose a 22 °C durante 24 horas, comprobándose siempre la viabilidad y pureza del cultivo.

Una vez comprobada la pureza del cultivo, las bacterias Pdp11 ó Pdp13 podían ya ser incorporadas al pienso en su forma fresca ó liofilizada previa determinación de la concentración de las mismas.

En el caso de que la incorporación al pienso de Pdp11 ó Pdp13 fuese en su forma liofilizada, las bacterias también eran recogidas de las placas mediante un porta estéril

hasta hacer una masa. Posteriormente, se introducían en tubos Falcon de 50 mL, que primero eran congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, y posteriormente liofilizados durante al menos 12 horas en un liofilizador FTS Flexi-dry modelo FD-1-84D-O (FTS Systems, Inc. NY, Estados Unidos) equipado con una bomba de vacío de 2400 A (Alcatel Cit, Annecy Cedex, Francia). Este último proceso fue siempre realizado a una presión de 0,075 mbar y, una vez concluido, se procedió a la determinación de la viabilidad de los liófilos. Para ello, 1 g de liófilo era resuspendido en una solución de PBS. A partir de esta solución se realizaban diluciones seriadas, que eran posteriormente sembradas en placas de TSAs e incubadas a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas para la determinación del número de bacterias cultivables presente en la muestra. Esta determinación se hacía por contaje directo. Para la realización de las infecciones experimentales, se utilizó la cepa Lg41/01 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. En los ensayos de inhibición *in vitro* se emplearon las cepas Lg16/00 de *Vibrio harveyi* y la cepa Lg41/01 de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Ambas cepas fueron cultivadas tanto en medio TSBs como en TSAs de la misma forma que ha sido explicado anteriormente para las dos bacterias probióticas, teniendo en cuenta que los tiempos de incubación para *V. harveyi* y *P. damsela* subsp. *piscicida* fueron de 24 y 48 horas, respectivamente.

Todas las cepas bacterianas empleadas fueron preparadas y suministradas por el Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga (Tabla 1). La actividad enzimática de las cepas probióticas utilizadas fue asimismo determinada (VITEK y API-ZYM).

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas en los diferentes ensayos realizados.

Cepa	Órgano	Especie	Año	DL50
<i>Vibrio harveyi</i> Lg16/00	Hígado	<i>Solea senegalensis</i> enfermo	2000	$7,4 \times 10^4$ ufc/g
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> Lg41/01	Hígado	<i>Solea senegalensis</i> enfermo	2001	$2,8 \times 10^4$ ufc/g
<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	Piel	<i>Sparus aurata</i>	2002	-
<i>Shewanella baltica</i> Pdp13	Piel	<i>Sparus aurata</i>	2002	-

1.1. Capacidad inhibitoria de los probióticos Pdp11 y Pdp13 frente a los patógenos *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*

La capacidad inhibitoria de los probióticos Pdp11 y Pdp13 frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi* (dos de los principales patógenos del lenguado senegalés) se ensayó mediante la determinación de la producción de sustancias inhibitorias frente a dichos patógenos. Asimismo, se valoró si dicha actividad inhibitoria se presenta también en los probióticos liofilizados, en los productos extracelulares (ECPs) en fresco ó inactivados por calor y en un extracto procedente de las cepas liofilizadas.

La técnica que se empleó para valorar la actividad antimicrobiana de los probióticos fue la del co-cultivo. Para la realización de esta prueba, los probióticos fueron cultivados en TSAs, según la metodología descrita con anterioridad, recogiendo la masa bacteriana resultante tras su incubación. Una parte de la masa bacteriana fue liofilizada. La obtención de las ECPs frescas a partir de las cepas probióticas se realizó siguiendo el protocolo descrito en la siguiente sección 1.1.1. Para

comprobar que las sustancias inhibidoras existentes en los ECPs son ó no termolábiles, se calentaron a 80 °C durante 60 min. Respecto a la obtención de los extractos de liofilizados a partir de ambas cepas probióticas, se suspendieron los liófilos en una solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) hasta alcanzar una concentración de 50 mg mL⁻¹. Posteriormente, mediante la aplicación de una ruptura por ultrasonidos (2 min, 50W de potencia) se logró un primer extracto. Dicho extracto fue centrifugado a 6000 xg, extrayéndose únicamente el sobrenadante que fue filtrado (22 µm de poro) para su esterilización.

Las dos cepas patógenas empleadas se suspendieron en una solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS, pH=7,4) hasta conseguir una turbidez cercana al 0,5 de McFarland (equivalente a una concentración de 10⁸ ufc mL⁻¹). Posteriormente, se sembraron sobre toda la superficie de la placa de TSAs mediante un hisopo estéril. Una vez sembradas las placas, se procedió a la realización de unos pocillos (de 7.5 mm de diámetro) sobre la superficie de las mismas con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Dichos pocillos fueron rellenados completamente con de 50 a 100 µL de la solución de cada parámetro seleccionado (bacteria fresca, bacteria liofilizada, ECPs frescas e inactivadas por calor ó extracto del liofilizado) hasta su llenado completo.

Las placas se incubaron durante 48 horas, tiempo suficiente para dejar crecer a los patógenos sobre la superficie. En el caso de la existencia de inhibición por parte de los probióticos y extractos, se observó un halo de inhibición en el crecimiento de dichos patógenos alrededor de los pocillos.

1.2. Obtención de Proteínas extracelulares (ECPs) de los probióticos Pdp11 y Pdp13

La obtención de las ECPs frescas a partir de las cepas probióticas se realizó mediante la técnica de Liu (1957). Para la extracción de las ECPs se sembraron ambas cepas probióticas en 10 placas de TSAs y se incubaron a 22 °C durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se eligió una de las colonias en cada una de las diez placas. Dichas colonias se inocularon en tubos con 3 mL de caldo TSBs. Posteriormente, de dichos tubos se tomaron 0,1 mL que se extendieron sobre una placa de TSAs cubierta por una lámina de celofán estéril, que fue incubada durante 48 horas a 22 °C. Todas las células de probiótico crecidas en dichas placas fueron recogidas y resuspendidas con 2 mL de agua estéril por placa mediante una micropipeta y centrifugadas a 13500 xg durante 20 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes fueron filtrados con filtros de acetato de celulosa de 0.22µm de diámetro de poro (Millipore, España) y utilizados ya como preparación de ECPs. Conservándose -20 °C hasta su uso posterior.

2.- Peces y dietas experimentales

2.1. Condiciones de cultivo y crecimiento de los ejemplares

Todas las experiencias del presente trabajo fueron realizadas en la planta de cultivos marinos “El Bocal” perteneciente al C.O. de Santander, con juveniles de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), de tamaños medios iniciales entre 10,5 y 26,7

g. Dichos ejemplares fueron siempre distribuidos al azar (140 - 200 peces m⁻²) en tanques provistos de agua de mar (150 - 500 L) con circuito abierto (salinidad 35,4 g L⁻¹ y temperatura 16,6 - 19,2 °C) y cubiertos por una malla de sombreo que permitió una iluminación de 50 lux. Todos los individuos utilizados tuvieron un periodo de aclimatación de dos semanas previo al inicio de las experiencias y fueron alimentados con diferentes piensos comerciales, (Skretting, Burgos, España).

Para determinar el crecimiento en longitud y peso de los ejemplares se realizaron muestreos periódicos con la ayuda de un ictiómetro y una balanza. El valor del peso obtenido en cada muestreo se utilizó además para ajustar la ración alimenticia diaria (10-20 g kg⁻¹).

La tasa de crecimiento específico en peso (SGR) fue calculada usando la ecuación

$$\text{SGR} = (\ln P_f - \ln P_i) / (t_f - t_i) \times 100$$

donde P_f, t_f, P_i y t_i son el peso (g) y tiempo (días) al final y al principio de la experiencia, respectivamente.

También se determinó la Producción neta (PN) como:

$$\text{PN} = B_f - B_i$$

donde la B_f es la biomasa final (g) y la B_i es la biomasa inicial (g)

La supervivencia fue calculada a lo largo de todo el periodo experimental.

Las dietas experimentales, con el probiótico incorporado, fueron preparadas inicialmente (ensayos PROBIO 1 y 2) en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, y posteriormente, tras la transferencia del protocolo entre centros (ensayos PROBIO 3 y 4), en el Instituto Español de Oceanografía (Santander). En esta tesis se probaron tres protocolos diferentes de incorporación de las cepas probióticas Pdp11 y Pdp13 a la dieta base. La alimentación de los ejemplares fue suministrada de forma manual a lo largo de todas las experiencias según las siguientes 8 tomas (9:30, 12:30, 15:30, 18:30, 21:30, 0:30, 3:30 y 6:30 horas).

2.2. Preparación de las dietas experimentales

2.2.1. Incorporación del probiótico fresco en pienso y posterior peletización

Para la preparación de la dieta experimental peletizada, se sembraron placas de TSAs con el probiótico (según el protocolo detallado con anterioridad en la sección 1), hasta obtener una concentración de 10⁹ ufc Kg⁻¹ de pienso. Dicha dosis fue descrita como efectiva para ejemplares de *S. aurata* y *S. senegalensis*, según (Díaz-Rosales, 2006; Díaz-Rosales, *et al.*, 2006). Las placas de TSAs fueron sembradas en césped mediante un hisopo estéril e incubadas a 22 °C durante 24 horas, Transcurrido este tiempo la masa bacteriana se recogió de las placas y se disolvió en una solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4).

Una vez pesada la cantidad necesaria de pienso, se molió con una batidora en un recipiente, sobre el que se añadió la solución de PBS con probiótico (70 mL de solución con probiótico por 100 g de pienso). Para lograr una mezcla homogénea en la solución con el pienso, se removió toda la masa con una batidora. Durante todo el proceso de amasado se cuidó que la masa resultante no se pegara ni a las paredes del recipiente ni a

la varilla de la batidora. El amasado final fue manual. Una vez lograda una masa homogénea, se montó la picadora, colocando la hélice y la placa perforada adecuada al tamaño de gránulo del pienso a fabricar. Se procedió entonces a cebar la picadora con la masa obtenida, hasta lograr la salida del pienso en tiras. El pienso así preparado fue secado a temperatura ambiente sobre papel de filtro y posteriormente fue deshecho de forma manual.

Todo el proceso de fabricación de pienso peletizado con probiótico se realizó con una periodicidad quincenal, conservándose a 4 °C hasta su posterior utilización.

2.2.2 Incorporación del probiótico fresco ó liofilizado en el pienso ya peletizado

Para la preparación de estas dos dietas experimentales se precisaron 6 placas de TSAs con probiótico por Kg de pienso. Dichas placas fueron sembradas en césped mediante un hisopo estéril e incubadas a 22 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, la masa bacteriana se recogió de las placas y ó bien se empleó en el momento (probiótico fresco) ó se liofilizó.

Una vez pesada la cantidad necesaria de pienso, las células bacterianas, frescas ó liofilizadas, se suspendieron en una solución de alginato sódico al 0,5 % (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Dicho compuesto se emplea debido a su inocuidad (para bacterias y animales) y por sus propiedades gelificantes. La suspensión bacteriana así preparada (100 mL kg⁻¹ de pienso), se espolvoreó sobre los gránulos de pienso mezclándose mediante agitación continua durante 10 minutos por medio de una batidora. A los diez minutos, se obtuvo una mezcla uniforme sobre la que se pulverizó rápidamente una solución de cloruro cálcico 50 mM (80 mL kg⁻¹) bajo agitación continua, obteniéndose un gel. La gelificación ocurre desde la superficie hacia el interior, produciéndose una cobertura superficial que atrapa las células bacterianas en la superficie de los gránulos de pienso. El pienso así adicionado fue secado a temperatura ambiente durante 15 minutos, periodo tras el cual estaba listo para su utilización, pudiendo asimismo ser conservado (4 °C) durante quince días. La dosis de probiótico empleada fue la misma que la descrita en la sección anterior 2.1 (10⁹ ufc g⁻¹). Este mismo protocolo se utilizó para la producción de la dieta control con alginato, a excepción de la adición del probiótico.

2.2.3 Viabilidad de los probióticos incluidos en el pienso

Con el fin de determinar el tiempo de vida de los dos probióticos (Pdp11 y Pdp13) tras su incorporación a los piensos (según las metodologías descritas en 2.2.1 y 2.2.2), se realizó un estudio de viabilidad.

Los piensos con los probióticos incorporados fueron almacenados a 4°C y a distintos intervalos de tiempo (0, 5, 10 y 15 días). Se recogieron muestras de 2 gr por réplica para determinar la viabilidad de las bacterias utilizadas.

Cada réplica de 2 g de pienso (3 réplicas por dieta) se mezcló con 20 mL de solución salina estéril tamponada PBS (pH= 7,4). La mezcla fue agitada para disgregar el pienso y solubilizar su contenido en la solución tampón. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 300 xg durante 5 min, para precipitar la parte insoluble, quedando en el sobrenadante las partículas menos pesadas y, entre ellas, las bacterias.

Una vez recogido el sobrenadante, se realizaron diluciones seriadas en PBS. Dichas diluciones (10 µL por cada dilución) se sembraron por triplicado en placas de TSAs y se incubaron a 22 °C durante 48 horas. Posteriormente, se determinó la concentración bacteriana existente mediante la realización del conteo directo de las colonias presentes en las placas.

3. Infecciones experimentales

Con el objeto de comprobar la protección conferida por los probióticos frente a la especie patógena *P. damsela* subsp. *piscicida*, se realizaron varias infecciones experimentales que tuvieron una duración de 21 días. Los ejemplares, elegidos al azar, fueron aclimatados una semana antes del comienzo de la prueba, manteniéndose en acuarios de 60 L (35,4 g L⁻¹ salinidad y 22-23 °C), cubiertos con una malla de sombreado (50 lux). La renovación diaria de agua fue del 100% y la alimentación se llevó a cabo según una toma diaria (1 % de la biomasa).

Cada duplicado de veinte peces por dieta fue anestesiado con una solución de aceite de clavo (87% eugenol, Guinama, Valencia, España) y etanol 96% (v/v) de 40 ppm, según protocolo de de la Gándara *et al.* (2003). Una vez anestesiados los ejemplares, se les inoculó intraperitonealmente con *P. damsela* subsp. *piscicida* Lgh41/01. En todos los casos, las dosis elegidas fueron de 4.8x10⁴ - 2.4x10⁵ ufc g⁻¹, dada la dosis letal 50 (DL50) registrada para lenguado por Díaz-Rosales *et al.* (2009). Diariamente y a lo largo de todas las experiencias, se registró la mortalidad en todos los grupos estudiados, comprobándose la presencia ó no del patógeno en los órganos internos de los ejemplares muertos (bazo, hígado y riñón), mediante siembra de los mismos en placas de TSAs (22 °C durante 48 horas) y posterior confirmación con el test de anticuerpos Mono-Pp (BIONOR, Skien Noruega).

Una vez finalizadas las pruebas y para poder evaluar la eficacia del probiótico añadido, se calculó el porcentaje de supervivencia relativa (RPS) descrito por Amend (1981) como:

$$RPS = [1 - (\% MP / \% MC)] \times 100$$

donde % MP es el porcentaje de mortalidad de los peces alimentados con el probiótico, y % MC es el porcentaje de mortalidad de los peces control

4. Análisis bioquímicos en probióticos, pienso, hígado y músculo de ejemplares

Para la determinación de la existencia ó no de diferencias a nivel de composición corporal entre los ejemplares alimentados con las dietas estudiadas al término de todas las experiencias, se tomaron al azar seis juveniles de lenguado senegalés de cada dieta. Dichos peces fueron anestesiados con una solución de aceite de clavo y etanol (40 ppm) como quedó descrito en la sección anterior. Seguidamente, se extrajeron muestras del músculo del lado ciego de la zona media dorsal pigmentada, tras la eliminación de la

piel. Asimismo, se tomaron muestras del hígado. Todas las muestras fueron conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis. También se determinó por triplicado la composición proximal de uno de los piensos utilizados y de las dos cepas probióticas ensayadas.

4.1. Medida de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (1976). Dicho método está basado en la reacción que tiene lugar en la solución acuosa del reactivo Comasie G-250 ó de Bradford. Este reactivo, en presencia de ácido fosfórico y en un entorno hidrofóbico proteico, produce una coloración azul intensa, susceptible de ser medida por espectrofotometría a 595 nm. Para la realización de la recta patrón en nuestras experiencias se utilizó albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich), a concentraciones entre $1500\text{-}125\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para la determinación de la concentración de proteínas en hígado, músculo, pienso ó probiótico se pesaron 5 mg de peso seco de cada muestra, que se colocaron en tubos de 18 mL. Se añadieron 500 μL de hidróxido sódico 1N, agitándose durante 30 minutos. A continuación se añadieron 2,5 mL de agua destilada, se sonicaron las muestras y se añadieron de nuevo 2 mL de agua destilada. Se tomaron entonces 50 μL de cada dilución patrón y se pasaron a tubos de 15 mL, haciendo lo mismo con un blanco de agua destilada. El mismo método se aplicó a las muestras, obteniéndose tres alícuotas de las mismas. Finalmente, se añadió 1,5 mL de reactivo Coomasie, previamente atemperado y homogeneizado, a cada una de las muestras e inmediatamente se procedió a su lectura en espectrofotómetro a 595 nm. Una vez realizadas las determinaciones de todas las muestras, se restó el valor del blanco y se aplicaron los resultados así obtenidos sobre la curva patrón, determinando la concentración de proteínas totales.

4.2. Medida de lípidos totales

Los lípidos totales fueron analizados mediante extracción con cloroformo-metanol (2:1) por el método de Bligh y Dyer (1959), modificado por Fernández Reiriz *et al.* (1989) y posterior determinación gravimétrica.

Para hacer los extractos, se pesaron de 25-30 mg de peso seco por muestra en tubos de 18 mL. Se homogenizaron en 2 mL de agua destilada y se sonicaron. La primera extracción se realizó con 2,5 mL de cloroformo + 2,6-Di-Ter-butyl-4-metilfenol (BHT, B-1378, Sigma-Aldrich) y 5 mL de metanol, centrifugándose a 3000 rpm durante 30 minutos. Se recogió el sobrenadante en tubo de 25 mL. Se llevó a cabo una segunda extracción, añadiendo al sedimento 2 mL de cloroformo + BHT y 1 mL de metanol y centrifugándose a 3000 rpm durante 30 minutos. Se recogió el sobrenadante junto con el extraído anteriormente en tubo de 25 mL. A continuación, se realizó la purificación del sobrenadante con 7,5 mL de cloroformo + BHT y 2,5 mL de agua destilada en una nueva centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos. La fase superior se descartó en su mayor parte, dejando un poco junto con la fase inferior en tubo graduado de fondo redondo sellado con teflón hasta el día siguiente ($8\text{ }^{\circ}\text{C}$), para su estabilización. La determinación se realizó por gravimetría en balanza analítica.

4.3. Análisis de ácidos grasos

Los ácidos grasos se analizaron en el cromatógrafo de gases (8700 Perkin Elmer, Beaconsfield, Inglaterra) previa transesterificación y metilación (Lepage y Roy, 1986).

Se colocó cada una de las muestras a analizar en un tubo de 18 mL, se añadió el volumen necesario (300-400 µg de lípidos) y 100 µg de patrón interno 19:0. Se agitó y procedió a la evaporación del disolvente por sequedad. Para la obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se añadieron 0,4 mL de tolueno y 1,5 mL de ácido sulfúrico-metanol al 1,5%. Se agitó y se colocó en estufa a 50 °C durante 16 horas. Una vez atemperada la muestra, se procedió a detener la transesterificación y neutralizarla añadiendo 15 mL de carbonato potásico al 6%. Se agitó para homogeneizar y se centrifugó a 3000 rpm durante 12 minutos, quedando los ésteres metílicos de los ácidos grasos en la fase superior. En un tubo cónico con tapón de vidrio, se añadió a la fase superior sulfato sódico anhidro para la retención de impurezas, y se inyectó 1 µL de la disolución de ésteres metílicos (aprox. 1 µg µL⁻¹).

Los ésteres metílicos se analizaron por cromatografía de gases en un Perkin Elmer, modelo Autosystem XL, provisto de un inyector split-splitless, temperatura programada y detector de ionización de llama (FID). La separación de los ésteres metílicos se realizó en una columna capilar SP-2330 (Supelco, Bellefonte, Estados Unidos) de 30 cm. de longitud y 0.25 mm de diámetro interno. La determinación cuantitativa se realizó mediante la adición a las muestras de un patrón interno (19:0, ácido nonadecanoico) y la comparación con un patrón comercial (Larodan, Halmö, Suecia).

Para la obtención y tratamiento de los datos se utilizó el software Totalchrom suministrado por Perkin Elmer

5. Análisis histológicos

Para la determinación de la existencia ó no de diferencias a nivel histológico entre las dietas estudiadas al finalizar las experiencias, se tomaron al azar tres ejemplares por réplica de cada dieta. Dichos individuos fueron anestesiados con una solución de aceite de clavo y etanol (40 ppm) como quedó descrito en la sección 3. A continuación, se tomaron muestras del músculo del lado ciego de la zona dorsal media pigmentada, del hígado y del tracto digestivo. Las muestras fueron tratadas como se describe a continuación:

5.1 Fijación e inclusión en parafina (Tissue-Tek VIP)

Los cortes de 2 - 4 mm de espesor se fijaron en formol tamponado (10%) durante varios días hasta su posterior procesado.

La inclusión en parafina incluyó los siguientes pasos y tiempos:

- | | | |
|----------------|-----------|-----------------|
| 1. Alcohol 70% | un paso | 30 min |
| 2. Alcohol 96% | dos pasos | 30 min cada uno |

- | | | |
|---------------------|--------------|-----------------|
| 3. Alcohol 100% | tres pasos | 30 min cada uno |
| 4. Xilol | dos pasos | 40 min cada uno |
| 5. Parafina a 56 °C | cuatro pasos | 30 min cada uno |

Tras ello, se realizaron bloques de parafina con parafina líquida, solidificándose con frío de la manera habitual.

5.2 Obtención de las secciones

Las muestras incluidas en los bloques de parafina se seccionaron utilizando un microtomo de rotación Leica RM 2245 (Leica, Wetzlar, Alemania). Los bloques se cortaron en secciones transversales y longitudinales de 5 µm de espesor, montándose sobre portaobjetos tratados con gelatina-alumbre de Cromo para evitar su desprendimiento (Waldemar Knittel, Braunschweig, Alemania)

5.3 Tinción con Hematoxilina-Eosina y PAS

La tinción con Hematoxilina-Eosina incluyó los siguientes pasos y tiempos:

1. Secado de portaobjetos en estufa a 56 °C 20 min
2. Desparafinado
 - a. Xilol dos pasos 10 min cada uno
 - b. Alcohol 100% dos pasos 1 min cada uno
 - c. Alcohol 96% dos pasos 1 min cada uno
 - d. Agua un paso 1 min
3. Tinción
 - a. Hematoxilina de Mayer (Merck) 6 min
 - b. Lavado en agua 1 min
 - c. Diferenciación en alcohol ácido (1%) 2 s
 - d. Lavado en agua 5 min
 - e. Eosina (Merck) 2 min
4. Deshidratación
 - a. Alcohol 96% dos pasos 2 min
 - b. Alcohol 100% dos pasos 2 min
 - c. Xilol dos pasos 2 min

La tinción con PAS mantuvo los pasos 1, 2, parte del 3 y todo el 4, siendo la tinción específica:

5. Tinción
 - a. Ácido periódico 0,5% 5 min
 - b. Agua 1 min

- c. Reactivo de Schiff (Merck) 30 min
- d. Agua 10 min
- e. Continuar con el paso 3a.

5.4 Montaje y observación al microscopio

Las secciones obtenidas fueron montadas con Pertex (Medite, Burgdorf, Alemania), cubiertas por cubreobjetos y estudiadas con un microscopio Leica DM400B, equipado con una cámara digital Leica DF350FX (Cambridge, Reino Unido). El tamaño máximo y volumen de las vacuolas de grasa se determinó mediante recuento de las gotas lipídicas medidas en 200 campos microscópicos con ayuda del software de la cámara. También se determinó la proporción de vacuola grasa existente dentro del tejido, mediante el empleo de una plantilla de dispersión de puntos.

6. Análisis inmunológicos

Con el fin de conocer el efecto de la incorporación de los probióticos Pdp11 y pdp13 en el pienso sobre la respuesta inmune específica e inespecífica en los juveniles de *S. senegalensis*, se tomaron al azar 5 individuos por tratamiento y réplica al finalizar las experiencias. Dichos ejemplares fueron anestesiados con una solución de aceite de clavo y etanol (40 ppm) como quedó descrito en la sección 3. A continuación, se procedió a la extracción de sangre para la obtención del suero. Se determinaron la actividad antiproteasa, actividad lisozima y el título de anticuerpos específicos frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* (ELISA) así como se realizó una determinación de las proteínas inmunogénicas mediante electroforesis (Western-Blot).

6.1. Obtención de suero.

Una vez anestesiados los ejemplares para la obtención del suero, se extrajo sangre de la vena caudal con jeringuilla de insulina de 1 mL estéril no heparinizada, previa limpieza del mucus existente en la zona de extracción. La sangre así obtenida se introdujo con cuidado, para evitar la lisis de los eritrocitos, en viales de 4,4 mL con gel para sueros (Sarstedt) y se dejó coagular a temperatura ambiente durante 3-5 horas. Posteriormente, se centrifugó en una centrífuga Sigma 3K18 (Osterode, Alemania) a 6000 xg a 4 °C durante 20 minutos y se extrajo sólo el sobrenadante. Este sobrenadante fue conservado en tubos de 1 mL, que fueron conservados a -80 °C hasta su posterior análisis utilización.

6.2. Obtención de bacterinas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

La preparación de las bacterinas a partir de *P. damsela* subsp. *piscicida* fue un paso previo necesario para la determinación de anticuerpos específicos frente a dicha especie que se describen en la siguiente sección 6.7. La bacteria patógena se sembró en

placas de TSAs y se incubó durante 48 horas a 22 °C, de forma análoga a la descrita en la sección 1, para así obtener una cantidad suficiente. Posteriormente, se recogió la masa bacteriana, se resuspendió en PBS (pH 7.4) y se centrifugó (Eppendorf, mod. 5810-R; Boeco, Alemania), a 6000 xg a 4 °C durante 20 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante, se resuspendió en el mismo volumen de PBS y se centrifugó de nuevo, repitiéndose este paso dos veces más. Finalmente, se resuspendieron las células en PBS y se ajustó la concentración bacteriana por espectrofotometría a 650 nm hasta 10^9 células mL⁻¹ (equivalente a 0,5-0,6 de densidad óptica). A dicha solución se le añadió formol al 0,5 % de concentración final y se conservó a 6 °C por 24 horas. Transcurridas este tiempo, se sembraron 0,1 mL de la bacterina por la técnica de extensión en placa de TSAs con asa de Digrasky, y se incubó durante 5 días a 22 °C. El preparado se consideró estéril cuando no se observó crecimiento de colonias en las placas. Finalmente, la bacterina se conservó a 6 °C hasta su uso posterior. Todo el proceso se realizó por triplicado.

6.3. Obtención de Proteínas de la Membrana externa (OMPs) de los probióticos Pdp11 y Pdp13

Obtener las proteínas de membrana externa (OMPs) de los probióticos será necesario para la determinación de las proteínas inmunogénicas en el suero de los peces (Western Blot) (sección 6.5). Para la obtención de esta fracción de los probióticos se empleó el protocolo de Lambert (1988). Las bacterias se incubaron en placas de TSAs durante 24 horas a 22 °C. Transcurrido este tiempo se recogió toda la masa bacteriana existente en tres placas de cultivo, resuspendiéndola en 10 mL de solución tampón fosfato estéril PBS (pH 7.4). A dicha resuspensión bacteriana se le realizaron tres lavados sucesivos con 10 mL de PBS y se centrifugó a 13500 xg durante 15 minutos a 4 °C. Una vez realizados los tres lavados sucesivos, las bacterias se volvieron a resuspender en el mismo volumen de PBS. Posteriormente, se comprobó que la absorbancia a 525 nm era superior a un valor de 2. Una vez comprobado esto, se centrifugó de nuevo a 13500 xg durante 30 minutos a 4 °C. Se eliminó entonces el sobrenadante y al precipitado se le añadieron 2 mL de una solución de PBS que contenía además 10 mM de ácido etilendiamintetracético (EDTA) y 2 mM de fenilmetilsulfonilfluoro (PMSF). Dicha resuspensión fue incubada durante 30 minutos a 45 °C en baño termostático. La función del PMSF es la de evitar la proteólisis, mientras que el EDTA estimula la disgregación de la estructura celular. Tras dicha incubación, se procedió a la aplicación de ultrasonidos (2 minutos, 50 W de potencia) descansando de un minuto a otro para evitar que la muestra se calentase demasiado. Tras la sonicación, la disolución se centrifugó a 13500 xg durante 20 minutos y se recogió el sobrenadante, el cual contenía ya las proteínas de membrana externa (OMPs) disueltas. La muestra con la fracción celular ya aislada se conservó a -20 °C hasta su posterior utilización.

6.4. Determinación del patrón de proteínas de las fracciones celulares (ECPs y OMPs) de los probióticos Pdp11 y Pdp13 mediante electroforesis

Este apartado es también un paso previo necesario para realizar la determinación de las proteínas inmunogénicas existentes en el suero de los peces (Western-blot) (sección 6.5). Dado que para la determinación del patrón proteico de las fracciones

celulares (ECPs y OMPs) es necesaria una cantidad de 200 µg de proteínas, primeramente se debió de determinar la concentración proteica total existente en las mismas, mediante el método de Bradford (1976). En esta ocasión se precisaron 5 µL de las muestras de ECPs ó OMPs previamente obtenidas (secciones 1.1.1 y 6.3), de las cuales se realizaron varias diluciones seriadas, junto con 250 µL de solución Bradford. Las mezclas fueron incubadas durante 15 minutos, tras lo que se determinó la concentración de proteínas por espectrofotometría a 590 nm mediante el lector de placas (Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific Inc. Madrid, España). Los datos obtenidos se compararon con una recta patrón realizada con albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich).

Una vez determinadas las concentraciones de proteínas en todas las fracciones celulares, con el fin de conseguir la cantidad final de 200 µg necesaria para la obtención del patrón, se ajustaron los volúmenes de las distintas muestras. Para conseguir la precipitación de las proteínas se añadieron tres volúmenes de acetona a -20 °C a cada muestra. Dicha mezcla fue incubada durante al menos tres horas. Posteriormente, todas las muestras se centrifugaron a 4000 xg durante 30 min. Se desecharon los sobrenadantes y se dejaron secar para eliminar los restos de acetona.

Una vez secas las muestras, con el fin de obtener una concentración final de 750 µg de proteínas·mL⁻¹, se resuspendieron en una solución tampón (tampón sodio-dodecil-sulfato, SDS-PAGE; ver Anexo). Posteriormente todas las muestras fueron incubadas durante 5 minutos en baño termostático con agua hirviendo para desnaturalizar las proteínas. Transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se conservaron a -20 °C hasta su posterior utilización.

Para la preparación del patrón de bandas (Tabla 2) se empleó el Bio-Rad Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range, que se calentó a 60 °C durante 1 minuto y se conservó a -20 °C hasta su posterior uso.

Tabla 2. Tamaños de las proteínas del patrón

Proteínas	Tamaño (KD)
Fosforilasa B	100,886
Albumina Sérica Bovina	97,320
Ovoalbumina	54,051
Anhidrasa Carbónica	37,554
Inhibidor de la tripsina	29,228
Lisozima	20,011

Los geles de electroforesis (ver Anexo) se prepararon en el siguiente orden:

- Gel de SDS. Poliacrilamida. Una vez introducido entre los cristales, se incubó durante 20 minutos para que el gel solidificara.
- Gel concentrador. Añadido sobre el anterior. Se esperó 20 minutos para que solidificara y posteriormente se retiraron los peines.

Los geles se corrieron durante 40 minutos a 250 V y amperaje constante, sin tener las muestras cargadas. Una vez transcurrido este tiempo, se cargaron las calles con 25 μ L de las muestras y 5 μ L del patrón, corriéndose en las mismas condiciones, durante aproximadamente 5 horas hasta que el frente llegase al final del gel. Seguidamente los geles se despegaron de los cristales y se tiñeron con Nitrato de Plata, empleándose el kit de tinción de proteínas (Sigma-Aldrich). Estos geles, una vez despegados se sumergieron en 300 mL de solución de fijación durante toda la noche. Tras la fijación, se realizó un lavado de los geles con 600 mL de agua ultrapura, durante 10 minutos. Una vez lavados, dichos geles fueron incubados durante 10 minutos en una solución de etanol al 70%. Al término de la incubación, se volvieron a lavar los geles con 600 mL de agua ultrapura. Después se sumergieron en 300 mL de la solución sensibilizadora del kit durante 10 minutos. Tras este paso, se lavaron de nuevo dos veces con 600 mL de agua ultrapura durante 10 minutos. Una vez que esto se hizo, los geles se incluyeron entonces en la solución de equilibrado de la plata, durante 10 minutos, realizándose por último un lavado con 600 mL de agua ultrapura durante 1-1,5 minutos. En este punto de la tinción se incluyeron los geles en la solución de Plata. Este paso puede llegar a durar unos 3-7 minutos en función del tamaño del gel o su concentración en proteínas, por lo que debe ser vigilado el desarrollo del color, de manera que al alcanzar la intensidad deseada en el gel, se pare el revelado con la solución de “stop” del kit. Transcurridos 5 minutos desde la adicción de dicha solución, se eliminó y se lavaron los geles con 600 mL de agua ultrapura durante 15 minutos. Tras el lavado, se renovó el agua ultrapura para el almacenaje de los geles.

6.5 Determinación de proteínas inmunogénicas mediante Western-blot

El Western-blot es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas. En esta tesis, se empleó para determinar la existencia ó no de diferencias en las proteínas inmunogénicas del suero de los peces alimentados con las distintas dietas. Este método conlleva los siguientes pasos: separación en gel de las proteínas, transferencia de las mismas a una membrana de nitrocelulosa para buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos frente a ella, detección de la unión antígeno-anticuerpo y estudio de la presencia de la proteína y su cantidad relativa respecto a otras proteínas. Para su realización se utilizó la técnica de McIntosh y Austin (1996).

Una vez obtenido el gel de electroforesis de cada una de las muestras (ver sección 6.4), se le añadió el tampón de carrera del Western-blot (ver Anexo), para equilibrarlo durante 10-15 min. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m de diámetro de poro usando un aparato de transferencia de proteínas semihúmedo (Transphor apparatus, Hoefer Inc, Holliston, MA, EEUU) a una potencia de 300 mA durante 1 hora. Para ello, se humedeció la superficie del aparato con tampón de carrera, y se colocó un papel (extra thick blot paper, Sigma-Aldrich) humedecido en el tampón de carrera. Posteriormente, se colocó la membrana, sobre la cual se transfirieron las proteínas. Seguidamente, se colocó el gel de electroforesis y, por último, se cubrió con otro papel humedecido en el tampón de carrera.

Una vez cerrado el aparato, se transfirieron las proteínas a 10 V y 300 mA, durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, para bloquear los sitios de unión específica, se extrajo la membrana y se introdujo en la solución bloqueante con tampón fosfato con

Tween 20 al 0.5 % junto con leche en polvo desnatada al 3% (p/v). La membrana extraída se mantuvo en dicha solución en condiciones de agitación continua suave durante un mínimo de 1 hora.

Posteriormente dicha membrana fue lavada con una solución tampón fosfato PBS-T, e incubada durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Tras este paso la membrana se incubó con los sueros de los peces tratados en una dilución 1:100 en PBS-T con 3% de leche desnatada durante 12 horas a 4 °C. Transcurrida la incubación se realizó un lavado con PBS-T y una nueva incubación con suero de conejo inmunizado frente a suero de lenguado, en una dilución 1:1000 en PBS-T con 3% de leche desnatada durante una hora. Después de un lavado con PBS-T, la membrana fue incubada durante 1 hora con anticuerpos de cabra conjugados con peroxidasa frente a anticuerpos de conejo en una dilución 1:5000 en PBS-T con 3% de leche desnatada. Finalmente, las membranas fueron lavadas dos veces con PBS-T y otras dos veces con PBS para poder pasar a ser visualizadas. La visualización de las membranas se realizó con la adición de 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (TMB) Substrato Estabilizado (Promega, Madison, WI, EEUU) durante al menos 10 minutos hasta que apareció el color azul de las bandas. Con la aparición de la coloración azul se procedió a parar la reacción mediante 3 lavados sucesivos de la membrana en agua destilada durante 5 minutos.

6.6. Titulación de anticuerpos específicos

Se llevó a cabo mediante la técnica ELISA indirecta (Robertson, *et al.*, 1998), que mide la concentración de anticuerpos que presentan los peces control frente a los alimentados con probióticos.

Se pusieron 50 µL de las preparaciones antigénicas a estudiar (20-40 µg antígeno/mL), en los pocillos correspondientes a muestras y blancos sólo con antígeno. En el caso de la bacterina se dispusieron 50 µL de una suspensión (absorbancia 1 a 600 nm), correspondientes a 10⁸ ufc/ mL (5 x 10⁷ ufc/ pocillo) para *P. damsela* subsp. *piscicida*. Por otro lado, se dispusieron 50 µL de PBS en nuevos pocillos correspondientes al blanco de reactivos. También se realizó un blanco con suero del ejemplar a analizar. Los pocillos se dejaron incubando toda la noche a 4 °C. A continuación se lavó tres veces con PBS y Tween 20 al 0,25% (PBS-T). Tras los lavados, se añadieron 300µL de PBS-T con leche desnatada en polvo al 3%, con el fin de cubrir los sitios de unión inespecíficos en los pocillos. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, lavando posteriormente tres veces con PBS-T al 0,25%.

Se pusieron 50 µL de las diluciones seriadas de los sueros en los pocillos correspondientes, mientras que en los pocillos de todos los blancos se añadieron 50 µL de PBS. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se lavó tres veces con PBS-T. Se añadieron 50µL del primer anticuerpo policlonal de conejo anti Ig de lenguado (producido por Sigma a partir de Ig de lenguado purificada por el Dpto. de Microbiología de la Universidad de Málaga), el cual se diluyó (1:1000) en una solución de PBS-T+ BSA al 0,25%. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con PBS-T. Se añadieron 50 µL del segundo anticuerpo (Ig de cabra anti-Ig de conejo y conjugado con peroxidasa, Sigma) el cual se diluyó (1:5000) en una solución de PBS-T+ BSA al 0,25%. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y seguidamente se lavó tres veces con PBS-T. Se añadieron 200 µL de la solución de revelado o-fenilendiamina dihidroclorídrico (OPD, Sigma), la cual se empleó para

desarrollar la respuesta colorimétrica. Se incubó durante 30 min en oscuridad. Se añadieron 50 μL de ácido sulfúrico 3M. Este paso se realizó para terminar la reacción de la solución de revelado. Por último se leyeron los resultados en un lector de placas (Thermo Electron Corporation) a una absorbancia de 490 nm. Las diluciones límite fueron usadas para obtener el título de anticuerpos específicos. Se definen como la dilución máxima del suero por encima de la cual el valor de la absorbancia es inferior a la suma de la media de los blancos más el doble de su desviación típica (Bergmeyer, *et al.*, 1983):

$$\text{Dilución límite} = \frac{\text{Absorbancia Dilución Máxima del suero} \geq \text{Absorbancia Media Blancos} + 2\text{SD}}$$

Para la titulación de inmunoglobulinas totales se hicieron diluciones seriadas de los sueros de los lenguados. De cada dilución se depositaron 50 μL en cada pocillo. Después de incubar toda la noche, los pocillos se lavaron con PBS-T. La saturación de la placa se realizó con leche desnatada en polvo al 3%. Tras dos horas se lavaron los pocillos con PBS-T. Los siguientes pasos son idénticos a los descritos para la determinación del título de anticuerpos específicos. Se añadieron 50 μL del primer anticuerpo policlonal de conejo anti Ig de lenguado a una dilución 1:1000 en una solución de PBS-T+ BSA. Se incubó durante 2 horas y se lavó con PBS-T. Se añadieron 50 μL del segundo anticuerpo (anti-Ig de conejo y conjugado con peroxidasa) a una dilución 1:5000 en PBS-T+ BSA. Se incubó durante 1 hora y seguidamente se lavó con PBS-T. Se añadieron 200 μL de OPD, incubándose durante 30 min. La reacción se paró con 50 μL de ácido sulfúrico 3M. Por último se leyeron los resultados a una absorbancia de 490 nm. A partir de estos resultados se obtuvieron las diluciones límite para las inmunoglobulinas totales.

6.7. Determinación de la actividad lisozima

Para determinar la actividad lisozima en el suero de los ejemplares se empleó el método de Kim y Austin (2006). En primer lugar, se realizaron diluciones seriadas de los sueros problema en solución estéril tampón fosfato PBS 0,05M (pH = 6,2). Posteriormente, se añadieron 100 μL de cada una de las diluciones en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Como control positivo, se utilizaron diluciones seriadas de lisozima de clara de huevo de gallina (Sigma-Aldrich) y, como control negativo, se empleó dicha solución PBS 0,05M (pH=6,2) en lugar de suero.

Una vez realizado esto, se preparó una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* (0,4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en solución estéril tampón fosfato PBS 0,05M (pH=6,2) y se añadieron 100 μL de la suspensión a cada pocillo, tanto a las diluciones de la muestra como a los controles negativo y positivo. Todo ello se incubó a una temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$, y se midió la absorbancia a 590 nm en espectrofotómetro (Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific Inc.) a los 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos. La reducción de la absorbancia con el paso del tiempo se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Reducción Absorbancia} = (\text{Abs}_t - \text{Abs}_i) / t$$

donde Abs_t y Abs_i son los valores de absorbancia a los tiempos t e inicial i y t es el tiempo.

Finalmente, se definió la unidad de lisozima como la concentración de muestra que produce una disminución en el valor de absorbancia de 0,001/ min (Kim y Austin, 2006).

6.8. Determinación de la actividad antiproteasa

Para el análisis de la actividad antiproteasa se utilizó el método de Thompson *et al.* (1995). Dicho método emplea como sustrato proteico la tripsina. La determinación se realizó por espectrofotometría a 430 nm de longitud de onda, siendo que a mayor degradación de tripsina menor actividad antiproteasa.

Para la realización del análisis se incubaron 20 μL de una solución de tripsina (Sigma-Aldrich T-0646, 1340 BAEE; 5mgmL^{-1}) con 0, 20, 40, 70 y 140 μL del suero problema, a una temperatura de 22 °C durante 10 minutos. Como control positivo, se empleó la solución estéril de tampón fosfato PB 0.1M (pH=7) con tripsina en lugar de suero y, como control negativo, se añadió la misma solución PB en lugar de suero y tripsina. Se completaron los volúmenes hasta alcanzar 350 μL con solución tampón fosfato PB 0,1M (pH 7). A continuación, se añadieron 250 μL de azocaseína (Sigma-Aldrich A-2765) a una concentración 1% p/v y se incubaron a 22 °C durante 1 hora. Transcurrido éste tiempo, se añadieron 500 μL de ácido tricloroacético al 10% y se incubaron las muestras a 22 °C durante 30 minutos. Se procedió entonces a la centrifugación a 4000 xg durante 5 minutos, recogiendo 100 μL del sobrenadante, que fue colocado en una placa de 96 pocillos de fondo plano. A continuación, se añadieron 100 μL de hidróxido sódico 1N como revelador, leyéndose la absorbancia en un espectofotómetro (Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific Inc.) a 430 nm. El porcentaje de inhibición de la actividad tripsina de cada muestra fue calculado mediante comparación con el control positivo según la fórmula siguiente:

$$\% I = \text{Abs}_m / \text{Abs}_{cp} * 100$$

donde % I es el porcentaje de inhibición de la actividad tripsina y Abs_m y Abs_{cp} son los valores de las absorbancias de la muestra y del control positivo (con tripsina y PB)

7. Microbiota digestiva

7.1. Extracción del DNA intestinal

Al término de la experiencia de adición de probióticos, se tomaron al azar cinco ejemplares por tratamiento y réplica de cada dieta, que fueron anestesiados con aceite de clavo (40 ppm) como queda descrito en la sección 3. Los contenidos intestinales de los ejemplares se extrajeron asépticamente y se almacenaron de forma individual a -80°C para su posterior procesamiento. Los contenidos intestinales se recogieron con 1 ml de PBS (pH 7.2), y se centrifugaron a 1,000 xg durante 5 minutos. A partir de cada una de las muestras intestinales se extrajo el DNA total, mezclando 300 μl de tampón de resuspensión (0.1 M Tris-HCl, 0.01 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8) y 300 μl tampón de lisis (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M EDTA, 0.01 M NaCl, 1% SDS, pH 8.0), e invirtiendo los tubos para conseguir una adecuada mezcla. Las muestras fueron tratadas con 32 μl de NaCl 6 M y proteinasa K ($150\ \mu\text{g mL}^{-1}$) a 55 °C durante 2 horas. Posteriormente, fueron

tratadas con RNasa A (10 mg ml⁻¹) a 37 °C durante 1 hora, tras lo cual se añadió NaCl 6 M para alcanzar una concentración final de 1.5 M. La solución se dejó en hielo durante 10 minutos, para después centrifugar 13,000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante conteniendo el DNA genómico se transfirió a otro tubo con un volumen igual de isopropanol. Los tubos se invirtieron varias veces, y el DNA fue sedimentado por centrifugación a 13,000 rpm durante 3 minutos. El DNA recogido se lavó en etanol al 70% y el DNA seco se resuspendió en 100 µl de tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) y almacenó a 4 °C. Para visualizar la calidad y el rendimiento del DNA, se usó la electroforesis en gel de agarosa (1.5%, p/v) en presencia de bromuro de etidio. Se hicieron crecer cultivos puros del probiótico Pdp11 en TSBs hasta 18 h, centrifugando posteriormente a 2,500 xg por 15 min. Los pellets obtenidos se lavaron con PBS y se emplearon para la extracción de DNA, empleando para ello el kit Fast DNA Spin (Qbiogene, CA, EEUU).

7.2. Amplificación de los genes 16S rDNA y análisis de los productos PCR por electroforesis en gradiente de gel desnaturizante (DGGE)

Para comparar los patrones de DGGE obtenidos a partir del análisis de la microbiota intestinal de los lenguados que recibieron las diferentes dietas, se amplificó el DNA correspondiente a los genes 16S rDNA, usando para ello cebadores específicos del dominio Bacteria, como el 968- GC-F (5' CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGCCCGG-GGGCACCGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC- 3') y el 1401-R (5'CGGT-GTGTACAAGACCC-3') (Konstantinov, *et al.*, 2003; Kim y Austin, 2006). Estos cebadores se emplean para amplificar las regiones V6-V8 del 16S rDNA (Nübel, *et al.*, 1996), y producen unos amplicones de 470-bp de longitud. Las mezclas de PCR (50 µl) contenían 1.25 U del enzima Taq polimerasa (Life Technologies Gaithersburg, MD, EEUU), 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 200 µM de cada uno de los desoxinucleótido trifosfato, 5 pmol de los cebadores, 1 µl del DNA molde y agua esterilizada por UV. La reacción PCR se realizó en un termociclador T1 (Whatman Biometra, Göttingen, Alemania) empleando 1 ciclo de 94 °C por 2 min, 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 56 °C 40 segundos, y 72 °C 1 minuto, seguido de 1 ciclo de 72 °C durante 5 minutos. Se analizaron por electroforesis alícuotas de 5 µl en geles de agarosa de 1.5% (p/v) conteniendo bromuro de etidio para comprobar la calidad y el tamaño de los productos. Los amplicones obtenidos a partir del DNA del lumen intestinal y de la cepa probiótica ensayada se separaron por DGGE, siguiendo las especificaciones descritas por Muyzer *et al.* (1993), usando un Dcode TM system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos). La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida al 8% (37.5:1 acrilamida-bisacrilamida; dimensiones de, 200 por 200 por 1 mm) mediante el empleo de un gradiente de desnaturización del 30% al 55% para la separación de los productos de la PCR. Los geles también presentaron el gradiente del 30% al 55% de urea y formamida incrementándose en la dirección de la electroforesis. Las muestras de PCR se pusieron en los geles en alícuotas de 13 µl por calle. Los geles se sometieron a electroforesis durante 16 h a 85 V en 0.5 X TAE (20 mM Tris acetate [pH 7.4], acetato sódico 10 mM, 0.5 mM Na₂-EDTA) a una temperatura constante de 60 °C (Sambrook, *et al.*, 1989) y posteriormente se tiñeron con AgNO₃ (Sanguinetti, *et al.*, 1994).

7.3. Análisis de los patrones de DGGE

Se llevó a cabo un análisis de todas las muestras sometidas a DGGE, escaneando todos los geles obtenidos a 400 dpi. El número de bandas de DGGE se calculó partir de las curvas densitométricas de los perfiles de DGGE escaneados con el programa FPQuest 4.5 (Applied Maths BVBA, Sint Martens Latem, Bélgica). Los patrones de agrupamiento de los diferentes perfiles de DGGE se consiguieron por la construcción de dendrogramas empleando el método de Unweighted Pair Groups (UPGMA) que utiliza las medias aritméticas. La similitud entre los patrones de DGGE se determinó por el cálculo de los coeficientes de similitud de Pearson y Dice (Konstantinov, *et al.*, 2003).

8. Análisis de metabolitos

Al finalizar la experiencia, se obtuvo material biológico para la evaluación de diversos parámetros metabólicos presentados a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 3. Material biológico obtenido y parámetros medidos.

Material biológico	Parámetro evaluado
Plasma	- Glucosa
	- Lactato
	- Triglicéridos
	- Proteínas totales
	-Acidos grasos
	-Aminoácidos
Hígado	- Glucosa
	- Glucógeno
	- Triglicéridos
	- Aminoácidos
Músculo	- Glucosa
	- Glucógeno
	- Lactato
	- Triglicéridos
	- Aminoácidos

8.1. Toma de muestras

Se tomaron al azar seis ejemplares por réplica de cada dieta, que fueron anestesiados con aceite de clavo. Se recogió toda la sangre mediante punción caudal utilizando jeringas de insulina previamente heparinizadas con una solución de 25,000 U de heparina amónica (Sigma-Aldrich, H-6279) en 3 mL de cloruro sódico al 0,9 %. Dichas muestras fueron recogidas en tubos Eppendorf de 1,5 mL heparinizados y mantenidas a 4 °C hasta su centrifugación. El proceso se llevó a cabo en una centrífuga Sigma-Aldrich 3K18 (Osterode, Alemania) a 10,000 xg durante tres minutos, separando el plasma de las células, manteniendo todo el proceso las muestras a 4 °C. Se obtuvieron dos alícuotas de plasma que fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C en tubos Eppendorf de 0,5 mL hasta su posterior análisis. El hígado fue extraído y pesado para la determinación del índice hepatosomático (IHS). Las muestras de

músculo e hígado fueron secadas con papel absorbente, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas (-80 °C) en tubos Eppendorf de 1,5 mL hasta su posterior análisis.

8.2. Homogenización

La medición de los parámetros metabólicos a nivel tisular precisa un homogenizado previo. Para ello se pesó el tejido recolectado y se introdujo en tubos de propileno, a los que se añadió ácido perclórico para desproteinizar la muestra y facilitar su homogeneización. El volumen (en μL) de ácido perclórico añadido (96 mL H_2O químicamente pura miliQ + 4 mL PCA 0,6 N) se calcula al multiplicar el peso de la muestra (en g) por 7500, obteniendo un factor de dilución 1/15 (m/v). A continuación se sonicó durante 30 segundos en un sonicador Microson XL (Misonix Inc., NY, Estados Unidos), manteniendo las muestras en frío. Posteriormente se añadió un volumen de solución de bicarbonato potásico (100 mL de H_2O miliQ + 10,01 g de bicarbonato potásico) igual al volumen de ácido perclórico utilizado. Finalmente se centrifugó a 10.000 - 13000 xg durante 30 minutos (4 °C) en una centrifuga Eppendorf 5810 R. El sobrenadante se recogió en tubos Eppendorf de 1,5 mL y se guardó a -80 °C hasta su posterior análisis.

8.3. Determinación de glucosa

La concentración de glucosa plasmática fue medida (Slein, 1963) mediante el kit comercial Spinreact S.A. (Ref. 1001200; Girona, España) adaptado a microplaca de 96 pocillos.

La glucosa es fosforilada por el adenosín trifosfato (ATP) en una reacción catalizada por la hexokinasa. Como resultado de esta fosforilación se produce glucosa-6-fosfato, que a su vez es oxidada a 6-fosfogluconato en presencia de nicotinamida adenín dinucleótido (NAD), en una reacción catalizada por glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Durante esta oxidación una cantidad equimolar de NAD es reducida a NADH, que tiene su máxima absorbancia a 340nm. Por este motivo, las variaciones de absorbancia que se produzcan a 340nm, serán directamente proporcionales a la concentración de glucosa.

Se prepararon unos estándares de glucosa (20 mM L^{-1}) a partir de glucosa anhidra (Panreac, Barcelona, España), con concentraciones de 0, 2, 5 y 10 mM L^{-1} . La solución reactiva fue preparada añadiendo 40 mL de agua destilada al bote de hidróxido potásico reactivo, agitado y calentado a 37 °C en un baño termostático. En los pocillos de la multiplaca (Greiner bio-one, Alemania), se repartieron 10 μL de cada muestra, por duplicado y de cada estándar por cuadruplicado, añadiendo a todos estos 200 μL de solución reactiva. La placa fue sellada con Parafilm "M" (Lab. Film American CanTM Chicago, Estados Unidos) e incubada a 37 °C en estufa durante 5 min. Posteriormente se midió la absorbancia usando doble longitud de onda: 340 nm para la lectura y 550 nm como referencia. Se empleó un lector de microplacas automático (EL 340, Bio-Tek Instrument, Winoosk, VT, Estados Unidos) controlado por el software DeltaSoft 3 para Macintosh (BioMetallics, Inc, NY, Estados Unidos). El ensayo fue lineal desde 0 a 20 mM/L.

8.4. Determinación de lactato

Este análisis se llevó a cabo (Iwama, *et al.*, 1989) por medio del kit comercial Lactate Reagent, (Spinreact ref. 1001330) adaptado a microplaca de 96 pocillos.

El ácido láctico es convertido a piruvato y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por medio de la lactato oxidasa. En presencia del peróxido de hidrógeno, la peroxidasa cataliza la condensación oxidativa de los precursores cromogénicos, originando un compuesto coloreado que tiene un máximo de absorbancia a 540 nm. La variación de absorbancia a esta longitud de onda es directamente proporcional a la concentración de lactato de la muestra.

Los estándares (Sigma-Aldrich) utilizados fueron: 0, 5, 10, 15 y 20 mg dL⁻¹. El reactivo fue reconstituido con 20 mL de agua destilada, agitado suavemente e incubado a 37 °C en un baño termostático. Las muestras de plasma fueron diluidas con agua destilada 1:1 (v/v) repartiendo 10 µL por duplicado en la microplaca, mientras que los estándares fueron distribuidos con igual volumen por cuadruplicado. Posteriormente fueron añadidos 200µL de reactivo. La placa fue sellada con Parafilm “M” e incubada durante 5 min a 37 °C en estufa. Al cabo de este tiempo se midió la absorbancia utilizando el lector de micro placas automático (EL 340, Bio-Tek), controlado por el software DeltaSoft 3, usando doble longitud de onda: 550 nm para la lectura y 630 nm como referencia. El ensayo se mostró lineal desde 0 a 20 mg dL⁻¹.

8.5. Determinación de proteínas totales

El análisis fue realizado (Smith, *et al.*, 1985) mediante el uso del kit comercial BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos), adaptado a microplaca de 96 pocillos.

El análisis de proteínas plasmáticas se realizó mediante la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} provocado por las proteínas en medio alcalino. El ión cuproso (Cu^{+1}) forma por quelación con dos moléculas de ácido bicinconínico (BCA) un compuesto púrpura hidrosoluble que presenta una fuerte absorbancia a 562 nm. La absorbancia a esta longitud de onda es directamente proporcional a la concentración de proteínas de la muestra.

Los patrones (Pierce) usados fueron: 0, 5, 10, y 20 µg/10µl a partir del kit comercial de BSA (2 mg mL⁻¹). La solución reactiva se hizo a partir de una mezcla de 20 mL de reactivo A y 400 µl de reactivo B, colocados a 37 °C en un baño termostático. En la microplaca se repartieron 10 µL de plasma, diluidos previamente 1:50 (v/v) con agua destilada, por duplicado, mientras que los estándares se repartieron con igual volumen pero por cuadruplicado. Posteriormente se adicionaron 200 µL de la solución reactiva por pocillo. La placa fue tapada con Parafilm “M” e incubada a 37 °C en una estufa durante 30 minutos y en oscuridad. Al cabo de este tiempo, se midió la absorbancia en un lector de micro placas automático (EL 340, Bio-Tek) controlado por el software DeltaSoft 3, utilizando doble longitud de onda: 550 nm para la lectura y 630 nm como referencia. El ensayo fue lineal desde 0 a 20 mgmL⁻¹.

8.6. Determinación de triglicéridos

El análisis de los triglicéridos (Bucolo y David, 1973) se llevó a cabo por medio del kit comercial Triglycerides (UV) (Spinreact ref. 1001311), 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. Una vez se ha fosforilado todo el glicerol, 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. Se preparó además una solución isotónica mezclando 0,9g de cloruro sódico con 100mL de agua destilada. Ambas soluciones fueron calentadas a 37 °C en un baño termostático. En la microplaca, se repartieron 5 µL de muestra por cuadruplicado. A dos de estos pocillos se les añadió 250 µL del reactivo de trabajo y a los otros dos 250 µL de solución isotónica. El blanco se preparó por cuadruplicado con 5 µL de agua destilada y 250 µL de la solución del reactivo de trabajo. La placa fue sellada con Parafilm "M" e incubada a 37 °C durante 10 minutos. Posteriormente fue medida la absorbancia utilizando el lector de micro placas automático (EL 340, Bio-Tek) controlado por el software DeltaSoft 3, usando doble longitud de onda: 340 para la lectura y a 550nm como referencia. El ensayo fue lineal desde 0 a 500 mg mL⁻¹.

La concentración de triglicéridos se obtuvo a partir de las variaciones de absorbancia entre el plasma tratado con el reactivo de trabajo y el tratado con solución isotónica, por medio de la siguiente expresión:

$$\text{mg triglicéridos dl}^{-1} = [(\text{Abs. Blanco} - \text{Abs. Muestra}) + \text{Abs. Blanca}] * 726$$

Como control se usó una solución estándar de triglicéridos 250mg dl⁻¹ (Sigma-Aldrich).

8.7. Determinación de aminoácidos libres totales

La determinación de los aminoácidos totales libres se realizó por análisis colorimétrico con nihidrina (Sigma-Aldrich).

Partiendo de la muestra homogeneizada (dilución 1:15), se centrifugó a 10.000-13.000 xg durante 3 minutos. Seguidamente, se diluyó el sobrenadante 50 veces, tomando 20 µL del mismo y añadiendo 980 µL de agua miliQ químicamente pura, obteniendo una dilución final de 1:750. A continuación, en una placa de 96 pocillos se añadieron: 140 µL de muestra diluida, 80 µL de acetato de cianuro y 80 µL de nihidrina (volumen final 300 µL pocillo⁻¹) y se incubó a 100 °C durante 15 minutos en seco,

dejando enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 590 nm utilizando el lector de micro placas automático (EL 340, Bio-Tek) controlado por el software DeltaSoft 3. La recta patrón se realizó con distintas concentraciones de L-alanina (Sigma-Aldrich) en agua químicamente pura: 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125, 0,0156 y 0,0078 mM de L-alanina.

8.8. Determinación de glucógeno

La determinación de glucógeno (Fig. 1) se basa en su hidrolización en glucosa, gracias a la acción de la amiloglucosidasa, de acuerdo con el método de Keppler and Decker (1974). La glucosa producida se determinó (Slein, 1963) mediante el kit comercial Spinreact (ref. 1001200), adaptado a microplaca de 96 pocillos y descrita la metodología en la sección 9.3. El cromógeno aparecido tras la reacción con el kit es directamente proporcional a la cantidad de glucógeno presente en la muestra.

Partiendo de la muestra homogeneizada (dilución 1:15), se centrifugó a 10.000-13.000 xg durante 3 min y retiró el sobrenadante. A continuación se prepararon dos soluciones de incubación compuestas por 480 µL ácido acético + 1,62 g de acetato de

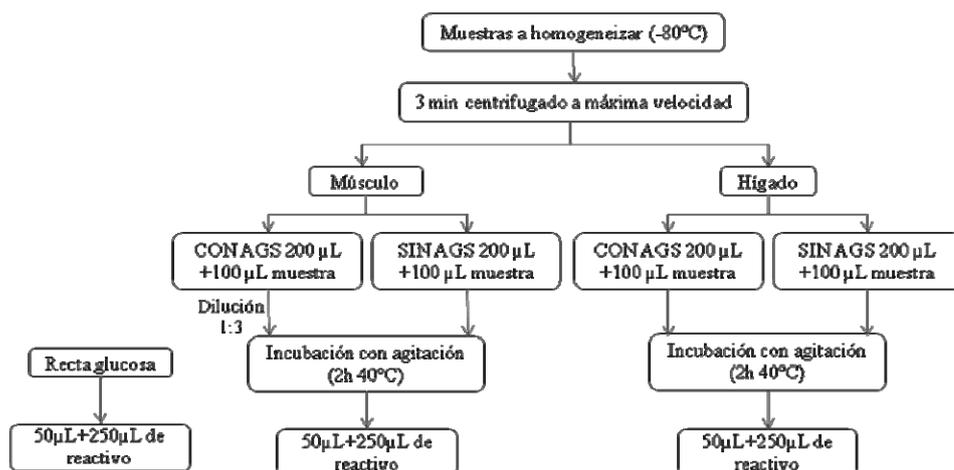


Figura 1. Metodología empleada para la medición de glucógeno en músculo e hígado.

sodio + 3H₂O, que fueron enrasadas hasta 100 mL con agua químicamente pura. La solución A llevará 0,7451 unidades de amiloglucosidasa µg⁻¹ de tejido (AGS, Sigma-Aldrich A7420), mientras que la B no. Así, esta última revelará la glucosa basal, que habrá de ser restada de la determinada mediante la solución A, permitiendo conocer el glucógeno existente.

9. Análisis estadísticos

El tratamiento de los datos para la obtención de los resultados biométricos, de composición corporal (proteínas, lípidos y ácidos grasos) y metabolitos (glucosa, glucógeno, lactato, proteínas totales, aminoácidos y triglicéridos) se realizó con el programa estadístico PASW Statistics 18. Se extrajeron los valores atípicos de las

muestras, eliminando aquellos datos que superasen en 2 veces la desviación típica, y se estudió la normalidad de las mismas (test de Kolmogorov-Smirnov).

A continuación, se realizó el contraste de hipótesis para la igualdad de medias de los juveniles de lenguado alimentados con las distintas dietas. Para el análisis de diferencias significativas entre las diversas clases de datos, se llevó a cabo, en primer lugar, un contraste F para la comparación de las varianzas, seguido de un contraste t para la comparación de medias. El test utilizado para este post-hoc fue el de Tukey, asumiendo igualdad de varianzas o el de Games-Howell cuando no se cumplía la homocedasticidad. Para conocer la homocedasticidad, se utilizó el test de Levene. El nivel de significación utilizado para establecer diferencias entre grupos fue de $P < 0,05$.

Cuando la distribución de los datos no era normal, las diferencias entre los tratamientos se realizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis complementado por el test de la Mediana y Jonckheere-Terpstra.

En cuanto a las infecciones experimentales realizadas, los porcentajes de mortalidad y porcentajes de supervivencia relativa (RPS) se analizaron mediante un Chi cuadrado.

Respecto a la microbiota analizada, los valores de los coeficientes de similitud obtenidos a partir de los patrones de DGGE para cada tratamiento se compararon empleando ensayos multiparamétricos.

10. Ensayos experimentales

10.1. Ensayo PROBIO 1 Influencia de la administración del probiótico Pdp11 fresco en crecimiento, composición corporal y resistencia frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. en lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) en engorde

Juveniles de lenguado de $23,9 \pm 8,4$ g de peso inicial fueron distribuidos al azar en tanques de poliéster de 500 L, cubiertos con una red de sombreado a una densidad de 140 ejemplares/m². Los tanques estaban provistos de un sistema de renovación de agua de mar en circuito abierto (1000 L h⁻¹) y de difusión de aire, siendo la temperatura natural entre 17-19,2 °C y la salinidad 35,4 g L⁻¹. Los ejemplares fueron aclimatados durante dos semanas previamente a la experiencia y alimentados con una dieta comercial (50% proteínas y 22% lípidos totales, Skretting, Burgos, España) al 3% mediante comederos automáticos. El probiótico Pdp11 fresco fue añadido al pienso (10⁹ ufc g⁻¹) utilizando la solución salina con probiótico (70 mL/100 g), según protocolo descrito en la sección 2.2.1. Se estableció un grupo control y otro Pdp11, por duplicado, que fueron alimentados durante dos meses. Los ejemplares no recibieron alimentación el día anterior al muestreo, siendo anestesiados con aceite de clavo (40 ppm, sección 3), previamente a la extracción de muestras

Los parámetros analizados fueron:

- Crecimiento en longitud y peso, calculándose las tasas de crecimiento diario (SGR) para ambos grupos y comparándose estadísticamente mediante el test no

paramétrico de Kruskal-Wallis complementado por el test de la Mediana y Jonckheere-Terpstra.

- Supervivencia final.
- Composición corporal (proteínas, lípidos totales y perfil de ácidos grasos) de músculo al término de la experiencia, según la metodología descrita en la sección 4. Los resultados obtenidos se compararon mediante un análisis de la varianza, empleándose el test de Tukey cuando las diferencias fueron significativas.
- Infección experimental (ip) con *P. damselae subsp. piscicida*. a los dos meses de adición del probiótico. Se utilizaron dos dosis (aproximadamente 3×10^5 y 3×10^4 ufc g^{-1} de pez), siendo la metodología empleada la descrita en la sección 3. Los porcentajes de mortalidad y porcentajes de supervivencia relativa (RPS) se compararon estadísticamente mediante un Chi cuadrado.
- Viabilidad bacteriana en pienso.

10.2. Ensayo PROBIO 2. Efecto de la administración de Pdp11 y Pdp13 liofilizados en el desarrollo y resistencia frente a *Photobacterium damselae subsp. piscicida* de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858)

Juveniles de lenguado de $26,7 \pm 4,6$ g de peso inicial fueron distribuidos al azar en tanques de poliéster de 150 L cubiertos con una red de sombreado, a una densidad de 174 peces m^{-2} . Los tanques estuvieron provistos de un sistema de renovación de agua de mar en circuito abierto (300 L h^{-1}) y de difusión de aire, siendo la temperatura $16,6 \pm 0,5$ °C y la salinidad $35,4 \text{ g L}^{-1}$. Los ejemplares fueron aclimatados durante dos semanas antes de la experiencia y fueron alimentados con una dieta comercial (50% proteínas y 22% lípidos totales, Skretting, Burgos, España) al 2% de la carga del tanque, ocho veces al día. Los probióticos Pdp11 y Pdp13 liofilizados fueron añadidos al pienso (10^9 ufc g^{-1}) utilizando una solución de alginato cálcico según protocolo descrito en la sección 2.2.2. Se establecieron tres grupos: control, Pdp11 y Pdp13, según triplicados, que fueron alimentados durante sesenta y nueve días. Los ejemplares no recibieron alimento el día anterior al muestreo, siendo anestesiados con aceite de clavo, previamente a la extracción de muestras.

Los parámetros analizados fueron:

- Crecimiento en longitud y peso, calculándose las tasas de crecimiento diario (SGR) para los tres grupos y comparándose estadísticamente mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.
- Supervivencia final.
- Composición corporal (proteínas, lípidos totales y perfil de ácidos grasos) de músculo e hígado de los tres grupos estudiados al finalizar la experiencia, según metodología descrita en la sección 4. Los resultados obtenidos se compararon mediante un análisis de la varianza, utilizándose el test de Tukey cuando las diferencias fueron significativas.
- Histología de músculo, hígado y digestivo en los tres grupos ensayados tras la adición del probiótico, según la metodología descrita en la sección 5, en donde el

volumen de las vacuolas grasas (%) se determinó por recuento de 200 campos microscópicos.

- Microbiota digestiva (DGGE) de los tres grupos estudiados al término de la experiencia, según metodología descrita en la sección 7. Las bandas de DGGE y los índices de similitud fueron calculadas con el software FPQuest 4.5 (Applied Maths BVBA, Sint MartensLatem, Bélgica). Se construyeron clusters de DGGE mediante la aplicación UPGMA.
- Infección experimental (ip) con *P. damsela* subsp. *Piscicida* al final de la experiencia de alimentación con probiótico. Se seleccionó la dosis 4.8×10^4 ufc g⁻¹, según la metodología descrita en la sección 3. Los porcentajes de mortalidad y porcentajes de supervivencia relativa (RPS) se analizaron mediante un Chi cuadrado.
- Viabilidad bacteriana en pienso.

10.3. Ensayo PROBIO 3. Adición de los probióticos Pdp11 y Pdp13 administrados en fresco en engorde de lenguado senegalés

Juveniles de lenguado de 15.0 ± 0.1 g de peso inicial fueron distribuidos al azar en tanques de poliéster de 150 l cubiertos con una red de sombreado a una densidad de 174 ejemplares m⁻². Los tanques estuvieron provistos de un sistema de renovación de agua de mar en circuito abierto (300 L h⁻¹) y de difusión de aire, siendo la temperatura 18.9 ± 0.1 °C y la salinidad 35,4 g L⁻¹. Los ejemplares fueron aclimatados durante dos semanas previamente a la experiencia y fueron alimentados con una dieta comercial (57% proteínas, 18% lípidos, Skretting, Burgos, España) al 2% de la carga del tanque. Se ensayaron dos dietas con los probióticos Pdp11 y Pdp13 frescos, incorporados al pienso (10⁹ ufc g⁻¹) mediante una solución de alginato cálcico, según lo descrito en la sección 2.2.2, frente a una dieta control. La experiencia se realizó por triplicado y tuvo una duración de dos meses. Los ejemplares no fueron alimentados el día anterior al muestreo y fueron anestesiados con aceite de clavo previamente a la extracción de muestras.

Los parámetros analizados fueron:

- Crecimiento en longitud y peso, calculándose las tasas de crecimiento diario (SGR) para los tres grupos y comparándose estadísticamente mediante ANOVA.
- Supervivencia final.
- Composición corporal de músculo e hígado en cada grupo ensayado al término de la experiencia y composición de los probióticos ensayados (proteínas, lípidos totales y perfil de ácidos grasos). Estas determinaciones fueron realizadas, según metodología descrita en la sección 4, comparándose los resultados obtenidos mediante un ANOVA y test post-hoc de Games-Howell.
- Histología de digestivo, hígado y músculo de los tres grupos estudiados al finalizar la adición de los probióticos, según la metodología descrita en la sección 5.
- Evolución de la microbiota digestiva (DGGE) (24, 48, 72, 96h, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 57 días), según la metodología descrita en la sección 7. Las bandas de

DGGE y los índices de similitud fueron calculados con el software FPQuest 4.5 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Se construyeron clusters de DGGE mediante la aplicación del UPGMA.

- Determinación de antiproteasa y anticuerpos específicos en suero de ejemplares al término de la experiencia según lo descrito en la sección 6.
- Viabilidad bacteriana en pienso.
- Caracterización bioquímica y enzimática de las cepas utilizadas.
- Ensayos de inhibición in-vitro frente a patógenos.

10.4. Ensayo PROBIO 4. Modulación del estado fisiológico e inmunológico de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*) alimentados con dietas adicionadas del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 fresco y liofilizado durante el preengorde

Juveniles de lenguado de $10,5 \pm 4,5$ g de peso inicial fueron distribuidos al azar en tanques de poliéster de 150 L cubiertos con una red de sombreado a una densidad de 200 ejemplares m^{-2} . Los tanques estuvieron provistos de un sistema de renovación de agua de mar en circuito abierto ($300 L h^{-1}$) y de difusión de aire, siendo la temperatura 18.0 ± 0.5 °C y la salinidad $35,4 g L^{-1}$. Los ejemplares fueron aclimatados durante dos semanas previamente a la experiencia, siendo alimentados con una dieta comercial (55% proteínas, 15% lípidos, Skretting, Burgos, España) al 2% de la carga del tanque. Se prepararon cuatro dietas: pienso control, pienso control con alginato, pienso con Pdp11 fresco y pienso con Pdp11 liofilizado, suspendidos en alginato cálcico a una concentración final de (10^9 ufc g^{-1} de pienso), tal como se describe en el apartado 2.2.2.

La experiencia se realizó por duplicado y tuvo una duración de cuatro meses, los dos primeros con adición de piensos preparados con ó sin probióticos, y los dos siguientes con dieta control para todos los grupos. Se dispuso además de tanques suplementarios para cada dieta con ejemplares destinados al estudio de la evolución de la microbiota digestiva, la respuesta inmunológica y la realización de la infección experimental. Los ejemplares no fueron alimentados el día anterior al muestreo, siendo anestesiados con aceite de clavo, previamente a la extracción de muestras.

Los parámetros analizados fueron:

- Crecimiento en longitud y peso cada tres semanas, calculándose las tasas de crecimiento diario (SGR) para los tres grupos y comparándose estadísticamente mediante ANOVA
- Supervivencia final.
- Composición corporal de músculo e hígado y de las dietas utilizadas (proteínas, lípidos totales y perfil de ácidos grasos) a los dos meses de adición de los probióticos. Ambas determinaciones fueron realizadas, según metodología descrita en la sección 4, comparándose los resultados obtenidos mediante ANOVA.
- Evolución de la microbiota digestiva (DGGE) durante la adición probiótica (15, 30 y 60 días) y al término de la misma (tras 30 días sin), según la metodología descrita en la sección 7. Las bandas de DGGE y los índices de similitud de Dice

fueron calculadas con el software FPQuest 4.5 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Se construyeron clusters de DGGE mediante la aplicación UPGMA.

- Evolución de la respuesta inmune durante la adición del probiótico (3, 7, 14 y 60 días) con determinación de la actividad lisozima, anticuerpos específicos, inmunoglobulinas totales, proteínas y proteínas inmunogénicas (Western-Blot) según lo descrito en la sección 6.
- Infección experimental (ip) con *P. damsela subsp. piscicida* a los quince días del inicio de la adición de los probióticos. Se seleccionó la dosis 4.8×10^4 ufc g⁻¹ de pez, siendo la metodología empleada la descrita en la sección 3. Los porcentajes de mortalidad y de supervivencia relativa (RPS) se analizaron mediante un Chi cuadrado.
- Análisis de metabolitos (glucosa, glucógeno, lactato, proteínas, aminoácidos, triglicéridos y ácidos grasos) en plasma, hígado y músculo de los diferente grupo estudiados, según lo descrito en la sección 8.
- Viabilidad bacteriana en pienso.

RESULTADOS

PROBIO 1

Influencia del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 fresco en el crecimiento, composición corporal y resistencia frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en lenguado (*Solea senegalensis*) durante el engorde

1.1. Resistencia frente a infección experimental con *P. damsela* subsp. *piscicida*

Los porcentajes de mortalidad acumulada de los ejemplares sometidos a infección experimental (ip) con *P. damsela* subsp. *piscicida* Lgh41/01 tras 60 días de alimentación con una dieta probiótica (Pdp11 fresca) y una control se reflejan en la Tabla 1. Dichos porcentajes fueron menores para el grupo que recibió adición de Pdp11 fresca (50-73%) respecto al grupo control (88.9-100%). Todas las mortalidades en los grupos experimentales fueron causadas por el patógeno ensayado, como se demostró a partir de cultivo de riñón, hígado y bazo y posterior confirmación con el test de anticuerpos Mono-Pp (Bionor). En algunos de los casos se observó la presencia de nódulos en el bazo y el hígado (Fig. 1). No se detectó mortalidad en los grupos de peces que recibieron inóculo de PBS, con lo que asimismo quedó descartada la mortalidad atribuible a parámetros relacionados con manipulación y estrés. Los porcentajes de supervivencia relativa (RPS) para el grupo alimentado con el probiótico Pdp11 fueron de 43,8%.



Figura 1. Sintomatología de pasteurellosis en juveniles de lenguado tras infección experimental con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Nótese la presencia de nódulos blancos en los órganos internos

Tabla 1. Porcentajes de mortalidad y RPS de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con dos dietas experimentales (control y probiótico Pdp11 fresco) y sometidos a infección experimental con *P. damsela* subsp *piscicida*.

	Peces muertos / Totales	Mortalidad (%)	RPS
Dieta Pdp11	14/19	73,7	26,3
	9/18	50,0	43,8
Dieta control	16/18	88,9	
	17/18	95,0	

RPS: Porcentaje de Supervivencia Relativa = $[1 - (\% \text{mortalidad en peces alimentados con Pdp11} / \% \text{mortalidad en controles})] * 100$.

1.2. Crecimiento de los ejemplares en cultivo

El crecimiento de los juveniles de lenguado alimentados durante 57 días con las dos dietas experimentales se muestra en la Tabla 2. Los ejemplares que recibieron la dieta adicionada con el probiótico Pdp11 fresco mostraron una tasa de crecimiento específica (SGR) significativamente mayor ($1,08\% \text{ día}^{-1}$) y una producción neta mayor (2426 g/tanque) que los alimentados con la dieta control ($0,91\% \text{ día}^{-1}$ y 1996 g/tanque, respectivamente). La supervivencia final registrada fue del 100% para ambos grupos experimentales.

Tabla 2. Crecimiento de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con dos dietas experimentales (control y probiótico Pdp11 fresco)

	Dieta Control	Dieta Pdp11
Peso inicial (g)	23,4 ± 1,9	24,4 ± 2,3
Peso final (g)	34,5 ± 3,1	37,8 ± 3,8
Biomasa inicial / tanque (g)	4214 ± 368	4384 ± 405
Biomasa final / tanque (g)	6211 ± 592	6810 ± 610
Producción neta / tanque (g)	1996 ± 220	2426 ± 276
Supervivencia (%)	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
SGR (% día ⁻¹)	0,91 ± 0,02 ^a	1,08 ± 0,02 ^b

SGR: Tasa de crecimiento específica. Media ± error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

1.3. Composición corporal de los ejemplares al término de la experiencia

Los valores medios de proteínas estuvieron alrededor del 77 g Kg^{-1} en músculo y de $28,2 \text{ g Kg}^{-1}$ en hígado. En cuanto a los lípidos totales determinados los valores oscilaron alrededor de $11,2 \text{ g Kg}^{-1}$ en músculo y $26,9 \text{ g Kg}^{-1}$ en hígado. No se registraron diferencias entre los ejemplares alimentados con las dos dietas experimentales (Fig. 2).

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos (%) en músculo de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con dos dietas experimentales (control y probiótico Pdp11 fresco).

Ácidos grasos	Dieta Control	Dieta Pdp11
14:0	2.91 ± 0.55	3.18 ± 0.62
14:1	0.10 ± 0.03	0.11 ± 0.03
15:0	0.09 ± 0.04	0.10 ± 0.05
16:0	18.0 ± 0.5	18.3 ± 1.1
16:1n-11	0.42 ± 0.05	0.45 ± 0.04
16:1n-9	0.37 ± 0.04	0.41 ± 0.11
16:1n-7	5.76 ± 1.07	5.67 ± 0.85
16:1n-5	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.07
17:0	0.77 ± 0.04	0.82 ± 0.12
16:2n-4	0.66 ± 0.13	0.65 ± 0.09
17:1	0.29 ± 0.03	0.27 ± 0.03
18:0	4.85 ± 0.62	4.82 ± 1.04
18:1n-9	12.8 ± 0.5	12.7 ± 0.8
18:1n-7	2.94 ± 0.09	2.97 ± 0.05
16:4	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01
18:2n-6	3.67 ± 0.42	3.77 ± 0.48
18:3n-3	0.73 ± 0.16	0.73 ± 0.12
20:1n-11	0.39 ± 0.04	0.40 ± 0.02
20:1n-9	2.95 ± 0.19	3.11 ± 0.49
20:1n-7	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.04
18:4n-3	1.71 ± 0.44	1.62 ± 0.25
20:4n-6	1.44 ± 0.17	1.37 ± 0.14
22:1n-11	2.25 ± 0.23	2.39 ± 0.44
22:1n-9	0.39 ± 0.05	0.42 ± 0.08
22:1n-7	0.10 ± 0.04	0.15 ± 0.05
20:4n-3	0.79 ± 0.08	0.72 ± 0.08
20:5n-3	6.87 ± 1.40	6.23 ± 0.69
22:5n-3	6.07 ± 0.52	6.21 ± 0.72
22:6n-3	22.0 ± 3.3	21.7 ± 1.8
PUFAs	44.1 ± 1.1	43.2 ± 1.7
SAFAs	26.6 ± 0.8	27.2 ± 1.7
MUFAs	29.3 ± 1.1	29.7 ± 1.3
n-3	38.1 ± 1.3	37.2 ± 1.6
n-6	5.12 ± 0.28	5.14 ± 0.40
n-9	16.5 ± 0.4	16.7 ± 0.4
n-3 HUFAs	35.7 ± 1.8	34.9 ± 1.7
n-3/n-6	7.48 ± 0.62	7.27 ± 0.58
EPA/DHA	0.32 ± 0.09	0.29 ± 0.05
ARA/EPA	0.22 ± 0.08	0.22 ± 0.04
ARA/DHA	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.01
DHA/EPA/ARA	2.32 ± 0.66	2.58 ± 0.41
MUFAs/ n-3 HUFAs	0.82 ± 0.07	0.85 ± 0.07
MUFAs/PUFAs	0.67 ± 0.04	0.69 ± 0.05
MUFAs/SAFAs	1.10 ± 0.06	1.10 ± 0.09
18:1n-9/ n-3 HUFAs	0.34 ± 0.03	0.39 ± 0.08

(Media ± error estándar). Diferentes letras significan diferencias significativas. (P<0,05)

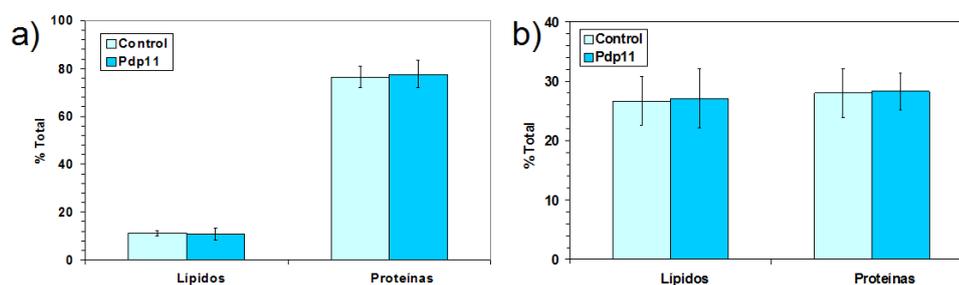


Figura 2. Proteínas y lípidos totales (g Kg^{-1}) en músculo (a) e hígado (b) de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con dos dietas experimentales (control y probiótico Pdp11 fresco) (Media \pm error estándar ; $P < 0,05$).

El perfil de ácidos grasos (%) detectado en el músculo de los ejemplares que recibieron la dieta probiótica *S. putrefaciens* Pdp11 fresca no mostró diferencias significativas con el grupo control (Tabla 3)

1.4. Viabilidad del probiótico en pienso.

El recuento de Pdp11 fresco incorporado en el pienso y determinado en TSAs estuvo alrededor de 8×10^6 ufc/g. No se detectaron bacterias cultivables después de 24 h, tanto a 4°C como a 22°C .

Efecto de la administración de *Shewanella* Pdp11 y Pdp13 liofilizadas, en el desarrollo y resistencia frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*).

2.1. Resistencia frente a infección experimental con *P. damsela* subsp. *piscicida*

Los porcentajes de mortalidad acumulada de los juveniles sometidos a infección experimental (ip) con *P. damsela* subsp. *piscicida* Lgh41/01 tras 69 días de alimentación con dos dietas probióticas (Pdp11 y Pdp13 liofilizadas) y una control se muestran en la Tabla 4. Como se puede observar, estos porcentajes fueron menores para los grupos probióticos (70-75% para Pdp11 y 65-70% para Pdp13 liofilizadas) que los registrados para el grupo control (100%). Todas las mortalidades de los grupos experimentales fueron causadas por el patógeno ensayado, como se demostró a partir de cultivo de riñón, hígado y bazo y posterior confirmación con el test Mono-Pp (Bionor). Como en la experiencia 1, en algunos casos se observó la presencia de nódulos en el bazo e hígado de los ejemplares. No se detectó mortalidad en los grupos de peces que recibieron inóculo de PBS, con lo que asimismo quedó descartada la mortalidad atribuible a parámetros relacionados con manipulación y estrés. Los porcentajes de supervivencia relativa (RPS) de los ejemplares alimentados con la dieta adicionada de Pdp11 y Pdp13 estuvieron entre el 27,5-32,5 % respectivamente.

Tabla 4. Porcentajes de mortalidad y RPS de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control y dos adicionadas con probióticos (Pdp11 y Pdp13 liofilizados) sometidos a infección experimental con *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Ensayo	Dietas	Peces muertos/totales	Mortalidad (%)	RPS
1	Pdp13L	14/20	70	30
	Pdp11L	15/20	75	25
	Control	20/20	100	
2	Pdp13L	13/20	65	35
	Pdp11L	14/20	70	30
	Control	20/20	100	

RPS: Porcentaje de Supervivencia Relativa = $[1 - (\% \text{mortalidad en peces alimentados con Pdp11} / \% \text{mortalidad en controles})] * 100$

2.2. Crecimiento de los ejemplares en cultivo

El crecimiento de los juveniles de lenguado alimentados durante 69 días con las tres dietas experimentales se muestra en la Tabla 5. Las tasas de crecimiento específico (SGR) fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) para los especímenes que recibieron la dieta control y la dieta con Pdp11 liofilizado ($0,69\% \text{ día}^{-1}$ y $0,62\% \text{ día}^{-1}$ respectivamente) frente a los que recibieron la dieta con la cepa Pdp13 liofilizado

(0,49% día⁻¹). Además se observó una menor dispersión en el peso final en los ejemplares alimentados con *S. putrefaciens* Pdp11 liofilizada. La supervivencia final registrada fue del 100% para todos los grupos experimentales.

Tabla 5. Crecimiento de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control y dos adicionadas con probióticos liofilizados (Pdp11 y Pdp13).

	Dieta Control	Dieta Pdp11L	Dieta Pdp13L
Peso inicial (g)	27,2± 1,8	25,3 ± 1,6	27,6 ±2,3
Peso final (g)	39,1 ± 3,7	35,3 ± 1,8	36,4 ± 3,5
Biomasa inicial / tanque (g)	3322 ± 214	3092 ± 197	3365 ± 280
Biomasa final / tanque (g)	4771 ± 449	4305 ± 224	4440 ± 430
Producción neta / tanque (g)	1448 ± 285	1214 ± 134	1074 ± 191
Supervivencia (%)	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
SGR (% día ⁻¹)	0,69 ± 0,13 ^a	0,62± 0,09 ^a	0,49 ± 0,07 ^b

SGR: Tasa específica de crecimiento. (Media ± error estándar). Diferentes letras significan diferencias significativas. P<0,05).

2.3. Composición corporal de los ejemplares al término de la experiencia

La composición corporal de músculo e hígado de los ejemplares alimentados con las tres dietas ensayadas se expone en la Figura 3. Los valores de proteínas fueron significativamente mayores (P<0,05) en el músculo de los ejemplares que recibieron la dieta adicionada de Pdp13 liofilizada (80,2 g Kg⁻¹) frente a los que recibieron la dieta control (67,3 g Kg⁻¹). Asimismo los niveles de proteínas en los ejemplares alimentados con Pdp11 liofilizada fueron mayores (77,5 g Kg⁻¹) que los del control, si bien no a un nivel significativo (P>0,05). En cuanto a los lípidos detectados en músculo, los peces alimentados con ambas dietas probióticas mostraron niveles ligeramente mayores (11.6 g Kg⁻¹Pdp11; 11,5 g Kg⁻¹ Pdp13) que los de la dieta control (9.89 g Kg⁻¹), aunque no a un nivel significativo (P>0,05).

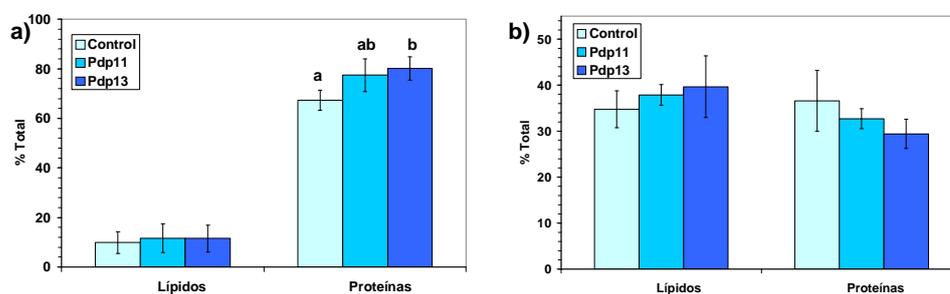


Figura 3. Composición corporal (%) en músculo (a) e hígado (b) de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control y dos adicionadas con probióticos liofilizados (Pdp11, Pdp13). (Media ± error estándar). Diferentes letras significan diferencias significativas (P<0,05).

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos (%) en músculo de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control y dos adicionadas con probióticos liofilizados (Pdp11 y Pdp13).

	Dieta Control	Dieta Pdp11L	Dieta Pdp13L
14:0	2.83 ± 0.20	3.34 ± 1.74	2.81 ± 1.24
14:1	0.04 ± 0.03	0.08 ± 0.04	0.05 ± 0.05
15:0	0.22 ± 0.11	0.27 ± 0.13	0.23 ± 0.15
16:0	17.6 ± 2.6	17.9 ± 1.8	17.1 ± 1.4
16:1n-11	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.07	0.32 ± 0.09
16:1n-9	0.25 ± 0.03	0.30 ± 0.11	0.31 ± 0.13
16:1n-7	4.84 ± 1.07	5.21 ± 2.27	5.12 ± 2.03
16:1n-5	0.19 ± 0.04	0.17 ± 0.07	0.23 ± 0.06
17:0	0.53 ± 0.06	0.59 ± 0.08	0.51 ± 0.02
16:2n-4	0.52 ± 0.06	0.52 ± 0.31	0.59 ± 0.27
17:1	0.33 ± 0.11	0.22 ± 0.11	0.25 ± 0.03
18:0	5.59 ± 1.38	5.70 ± 1.46	5.58 ± 1.33
18:1n-9	13.0 ± 1.0	13.7 ± 0.2	13.9 ± 0.9
18:1n-7	3.14 ± 0.28	3.05 ± 0.11	3.13 ± 0.11
18:2n-6	4.31 ± 0.68	4.38 ± 0.50	4.71 ± 0.54
18:3n-3	0.77 ± 0.27	0.81 ± 0.20	0.90 ± 0.20
20:1n-11	0.33 ± 0.04	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.02
20:1n-9	1.85 ± 0.37	2.26 ± 0.25	2.27 ± 0.16
20:1n-7	0.22 ± 0.07	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.03
18:4n-3	1.36 ± 0.57	1.10 ± 0.37	1.15 ± 0.37
20:4n-6	1.60 ± 0.26	1.51 ± 0.45	1.57 ± 0.50
22:1n-11	1.35 ± 0.44	1.66 ± 0.46	1.71 ± 0.31
22:1n-9	0.26 ± 0.11	0.30 ± 0.08	0.35 ± 0.07
22:1n-7	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.09 ± 0.02
20:4n-3	0.70 ± 0.21	0.57 ± 0.10	0.61 ± 0.13
20:5n-3	8.13 ± 1.56	6.94 ± 0.45	7.13 ± 0.38
22:5n-3	8.13 ± 1.56	6.94 ± 0.44	7.13 ± 0.38
22:6n-3	22.9 ± 2.9	22.4 ± 6.1	19.3 ± 1.3
PUFAs	47.0 ± 1.0	44.2 ± 5.6	45.5 ± 5.2
SAFAs	26.8 ± 4.2	27.9 ± 2.1	26.3 ± 1.6
MUFAs	26.2 ± 3.4	28.0 ± 3.7	28.3 ± 3.9
n-3	40.4 ± 0.5	37.7 ± 5.9	38.4 ± 6.3
n-6	5.90 ± 0.48 ^a	5.88 ± 0.20 ^a	6.28 ± 0.10 ^b
n-9	15.3 ± 1.4	16.6 ± 0.6	16.9 ± 1.2
n-3 HUFAs	38.3 ± 0.6	35.7 ± 6.5	36.3 ± 6.1
n-3/n-6	6.88 ± 0.53	6.41 ± 1.02	6.12 ± 0.93
EPA/DHA	0.36 ± 0.11	0.33 ± 0.11	0.33 ± 0.08
ARA/EPA	0.21 ± 0.07	0.22 ± 0.07	0.22 ± 0.06
ARA/DHA	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00
DHA/EPA/ARA	1.83 ± 0.45	2.16 ± 0.16	2.05 ± 0.24
MUFAs/n-HUFAs	0.68 ± 0.10	0.82 ± 0.25	0.81 ± 0.24
MUFAs/PUFAs	0.56 ± 0.06	0.65 ± 0.16	0.64 ± 0.16
MUFAs/SAFAs	1.01 ± 0.28	1.00 ± 0.07	1.08 ± 0.10
18:1n-9/n-3HUFAs	0.34 ± 0.03	0.39 ± 0.08	0.39 ± 0.09

(Media ± error estándar). Diferentes letras significan diferencias significativas. (P<0,05).

Respecto al perfil de ácidos grasos (%) detectado en músculo (Tabla 6), se observaron valores de ácidos grasos n-6 significativamente mayores para los ejemplares alimentados con la dieta Pdp13 liofilizada (6,28 g Kg⁻¹), respecto a los que recibieron tanto la dieta Pdp11 liofilizada (5,88 g Kg⁻¹) como la dieta control (5,90 g Kg⁻¹). El resto de los ácidos grasos no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales.

No se registraron diferencias significativas en los valores de proteínas (29,4-36,6 g Kg⁻¹) y de lípidos totales (34,8-39,7 g Kg⁻¹) según las dietas suministradas (Fig. 2), aunque se detectó una tendencia a valores ligeramente menores de proteínas y mayores de lípidos en el hígado de los peces alimentados con la dieta Pdp13 liofilizada (P>0,05). El perfil de ácidos grasos (%) determinado en hígado reveló la existencia de mayores diferencias entre las tres dietas que las observadas en músculo (Tabla 7). A pesar de que en el hígado los niveles de ácidos grasos de la serie n-3 fueron similares (31,5-35,4 g Kg⁻¹) entre los diferentes grupos experimentales, se registraron niveles significativamente superiores de ácidos grasos de las series n-6 y n-9 en los ejemplares alimentados con Pdp11 (8,56 y 18,5 g Kg⁻¹) y Pdp13 (8,79 y 18,9 g Kg⁻¹) frente a los detectados en el grupo control (7,29 y 14,5 g Kg⁻¹) (P<0,05). Así, el índice n-3/n-6 también se vio influido, siendo significativamente mayor en los peces del grupo control (4,88 g Kg⁻¹) que en los del grupo Pdp13 liofilizado (3,57 g Kg⁻¹). No se observaron diferencias significativas para los ácidos araquidónico (20:4n-6) y eicosapentanoico (20:5n-3) entre los peces que recibieron las distintas dietas. Sin embargo, los niveles de ácidos monoinsaturados (MUFAs) fueron significativamente mayores (33,2 g Kg⁻¹) y los del ácido docosahexanoico (22:6n-3) significativamente menores (17,3 g Kg⁻¹) en los ejemplares alimentados con la dieta Pdp13 liofilizada frente a aquellos del grupo control (28,9 g Kg⁻¹, MUFAs; 21,4 g Kg⁻¹, DHA) (P<0,05). Además, los niveles de ácidos linolénico (18:3n-3) y linoleico (18:2n-6) fueron significativamente superiores en los peces alimentados con ambas dietas probióticas: Pdp11 (1,37 g Kg⁻¹ y 6,75 g Kg⁻¹, respectivamente) y Pdp13 liofilizadas (1,46 g Kg⁻¹ y 7,08 g Kg⁻¹, respectivamente) frente a la dieta control (0,81 g Kg⁻¹ y 5,05 g Kg⁻¹, respectivamente) (P<0,05). Por el contrario, los niveles de ácidos estearidónico (18:4n-3) y 20:4n-3 fueron significativamente menores en los ejemplares que recibieron ambas dietas probióticas, Pdp11 (0,92 g Kg⁻¹ y 0,76 g Kg⁻¹ respectivamente) y Pdp13 (0,98 g Kg⁻¹ y 0,77 g Kg⁻¹ respectivamente) en comparación con los alimentados con la dieta control (1,34 Kg⁻¹ y 1,06 Kg⁻¹ respectivamente) (P<0,05). La diferencia observada para estos dos ácidos grasos en el hígado también se vio reflejada de un modo no significativo en el músculo. Señalar por último que también existieron diferencias significativas en los ácidos grasos 17:1 y 18:1n-9 entre los especímenes suplementados con Pdp11 (0,36 Kg⁻¹ y 16,2 Kg⁻¹ respectivamente) y Pdp13 (0,35 Kg⁻¹ y 16,5 Kg⁻¹ respectivamente) frente al grupo control (0,51 Kg⁻¹ y 12,3 Kg⁻¹ respectivamente) (P<0,05).

Tabla 7: Perfil de ácidos grasos (%) en hígado de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control y dos adicionadas con probióticos liofilizados (Pdp11 y Pdp13).

Ácido grasos	Dieta Control	Dieta Pdp11L	Dieta Pdp13L
14:0	4.02 ± 1.14	3.83 ± 0.82	4.25 ± 1.23
14:1	0.10 ± 0.06	0.08 ± 0.04	0.08 ± 0.05
15:0	0.35 ± 0.14	0.39 ± 0.07	0.36 ± 0.16
16:0	17.8 ± 1.1	17.0 ± 1.4	16.6 ± 1.6
16:1n-11	0.50 ± 0.10	0.40 ± 0.07	0.40 ± 0.06
16:1n-9	0.48 ± 0.17	0.61 ± 0.14	0.56 ± 0.17
16:1n-7	7.07 ± 1.49	6.93 ± 0.72	7.17 ± 1.15
16:1n-5	0.30 ± 0.08	0.22 ± 0.03	0.26 ± 0.04
17:0	0.86 ± 0.17	0.80 ± 0.11	0.61 ± 0.15
16:2n-4	0.68 ± 0.18	0.70 ± 0.07	0.78 ± 0.14
17:1	0.51 ± 0.05 ^a	0.36 ± 0.07 ^b	0.35 ± 0.03 ^b
18:0	4.54 ± 0.95	3.75 ± 0.39	3.75 ± 0.22
18:1n-9	12.3 ± 1.0 ^a	16.2 ± 1.4 ^b	16.5 ± 1.0 ^b
18:1n-7	3.96 ± 0.23	3.80 ± 0.09	3.91 ± 0.15
16:4	0.18 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01
18:2n-6	5,05 ± 0,16 ^a	6,75 ± 0,17 ^b	7,08 ± 0,17 ^b
18:3n-3	0,81 ± 0,07 ^a	1,37 ± 0,03 ^b	1,46 ± 0,06 ^b
20:1n-11	0.25 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.25 ± 0.02
20:1n-9	1.40 ± 0.06	1.42 ± 0.09	1.47 ± 0.17
20:1n-7	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.03
18:4n-3	1.34 ± 0.17 ^a	0.92 ± 0.12 ^b	0.98 ± 0.15 ^b
20:4n-6	2,25 ± 0,96	1,81 ± 0,35	1,72 ± 0,22
22:1n-11	1.32 ± 0.10	1.22 ± 0.12	1.41 ± 0.18
22:1n-9	0.29 ± 0.05	0.36 ± 0.09	0.38 ± 0.03
22:1n-7	0.17 ± 0.06	0.14 ± 0.04	0.16 ± 0.05
20:4n-3	1.06 ± 0.09 ^a	0.76 ± 0.03 ^b	0.77 ± 0.07 ^b
20:5n-3	4,09 ± 1,24	3,99 ± 0,84	4,09 ± 1,30
22:5n-3	6.71 ± 0.21	6.26 ± 1.25	6.92 ± 1.85
22:6n-3	21,4 ± 1,6 ^a	19,3 ± 1,3 ^{a,b}	17,3 ± 0,7 ^b
PUFAs	43,5 ± 3,5	42,0 ± 1,5	41,2 ± 4,0
SAFAs	27,5 ± 1,3	25,8 ± 2,2	25,6 ± 2,9
MUFAs	28,9 ± 2,6 ^a	32,2 ± 1,9 ^{a,b}	33,2 ± 1,6 ^b
n-3	35,4 ± 7,3	32,6 ± 1,4	31,5 ± 3,8
n-6	7,29 ± 0,92 ^a	8,56 ± 0,38 ^b	8,79 ± 0,34 ^b
n-9	14,5 ± 1,1 ^a	18,5 ± 1,6 ^b	18,9 ± 1,0 ^b
n-3 HUFAs	33.2 ± 2.8	30.3 ± 1.2	29.0 ± 3.7
n-3/n-6	4,88 ± 0,34 ^a	3,82 ± 0,16 ^{a,b}	3,57 ± 0,32 ^b
EPA/DHA	0.19 ± 0.05	0.21 ± 0.04	0.24 ± 0.07
ARA/EPA	0.55 ± 0.14	0.46 ± 0.06	0.44 ± 0.10
ARA/DHA	0.10 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.01
DHA/EPA/ARA	2,82 ± 1,26	2,91 ± 1,05	2,68 ± 0,86
MUFAs/n-3 HUFAs	0.88 ± 0.15	1.06 ± 0.08	1.16 ± 0.18
MUFAs/PUFAs	0.67 ± 0.11	0.77 ± 0.06	0.81 ± 0.10
MUFAs/SAFAs	1.05 ± 0.08	1.26 ± 0.18	1.31 ± 0.13
18:1n-9/ HUFAs	n-3 0.37 ± 0.06 ^a	0.53 ± 0.04 ^b	0.58 ± 0.08 ^b

(Media ± error estándar). Diferentes letras significan diferencias significativas. (P<0,05).

2.4. Histología de músculo, hígado e intestino de ejemplares al término de la experiencia

Las imágenes al microscopio óptico del músculo de ejemplares alimentados con las tres dietas experimentales presentaron la acumulación característica de grasa debajo de la piel y entre las fascias musculares (Fig. 4). Este almacenamiento lipídico entró ligeramente en las fascias musculares de los peces que recibieron ambas dietas probióticas, siendo el efecto más acusado en los juveniles alimentados con la dieta Pdp13 liofilizada (Fig.4c).

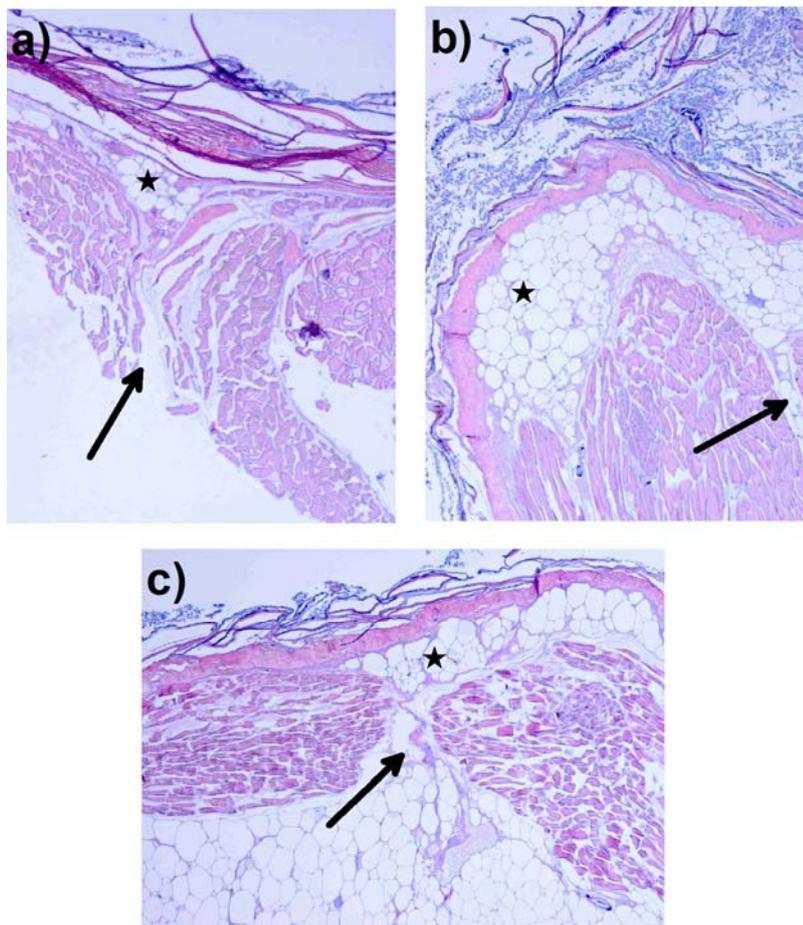


Figura 4. Imágenes al microscopio óptico de vacuolas grasas (400X) en músculo de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control (a) y dietas adicionadas de Pdp13 (b) y Pdp11 (c) liofilizados. La estrella muestra el almacenamiento lipídico habitual y la flecha, aquel que penetra en las fascias musculares.

Las imágenes al microscopio óptico del hígado de juveniles alimentados con las tres dietas experimentales se presentan en la Figura 5. No se registraron diferencias significativas entre los ejemplares alimentados con la dieta control y la Pdp13 liofilizada, con rangos de acumulación lipídica entre 52 y 56,3 %. (Tabla 8). Por el contrario, los peces que recibieron la dieta probiótica Pdp11 liofilizada mostraron una significativa menor acumulación de vacuolas grasas en los hepatocitos (20,7%) ($P < 0,05$).

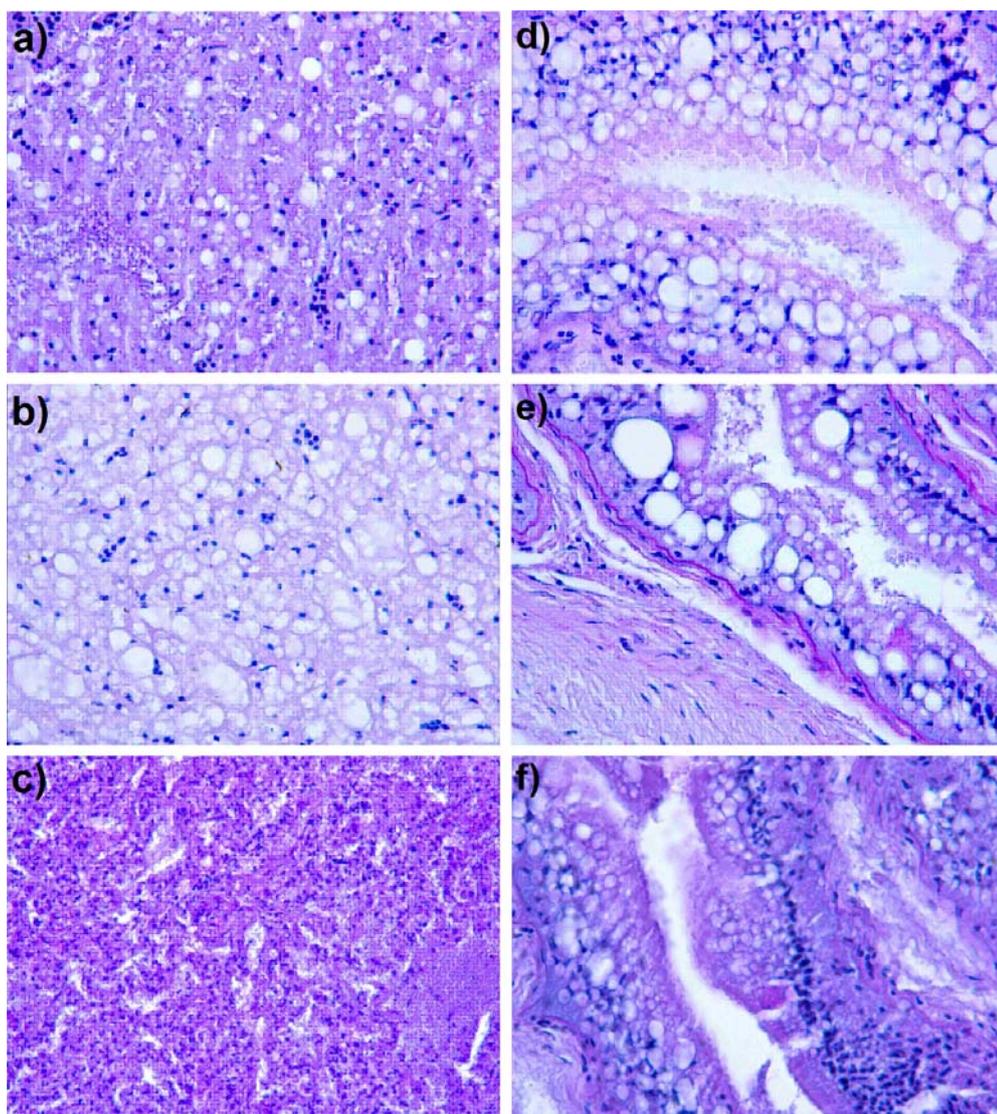


Figura 5. (a) Imágenes al microscopio óptico de vacuolas grasas (400X) en hígado de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control, (b) alimentados con dietas adicionadas de Pdp11 liofilizada, y (c) adicionadas de Pdp13 liofilizada. (d) Imágenes al microscopio óptico de vacuolas grasas (400X) en enterocitos de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control; (b) alimentados con dietas adicionadas de Pdp11 liofilizada, y (c) adicionadas de Pdp13 liofilizada.

El análisis histológico de los enterocitos mostró un mayor número de vacuolas grasas, asimismo de mayor tamaño, en los ejemplares alimentados con las dietas control y suplementada con Pdp13 liofilizada (Fig. 5 d,f). Los especímenes alimentados con la dieta Pdp11 liofilizada mostraron un número significativamente menor de vacuolas grasas ($P < 0,05$) en los enterocitos (43,4%; Fig. 5e). El porcentaje de campos ocupado por las gotas lipídicas en el intestino de todos los peces estuvo comprendido entre 43,4% y 57,1% (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de campos del epitelio intestinal e hígado con acumulación lipídica en juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control y dietas adicionadas de Pdp11 y Pdp13 liofilizadas. (Media ± error estándar; P<0,05).

Dieta	Intestino	Hígado
Control	55,4 ± 1,1 ^a	56,3 ± 1,1 ^a
Pdp11L	43,4 ± 0,9 ^b	20,7 ± 0,4 ^b
Pdp13L	57,1 ± 1,1 ^a	52,0 ± 1,0 ^c

Diferentes letras significan diferencias significativas. P<0,05).

2.5. Estudio de la microbiota intestinal al término de la experiencia

Los resultados derivados del análisis PCR-DGGE y secuenciación de bandas mostraron la existencia de una modulación en la microbiota digestiva de los peces de acuerdo a la alimentación con ambas dietas probióticas. Para poder interpretar los resultados se establecieron tres clusters en base al cálculo del índice de similitud entre las muestras (Fig. 6). Los ejemplares que recibieron la dieta control presentaron mayor similitud con los alimentados con la dieta Pdp11 liofilizado (72%) que con respecto a los alimentados la dieta Pdp13 liofilizado (58%). El grupo que presentó una mayor homogeneidad fue el correspondiente a los peces que recibieron la dieta Pdp13 liofilizado, con un índice de similitud del 80%.

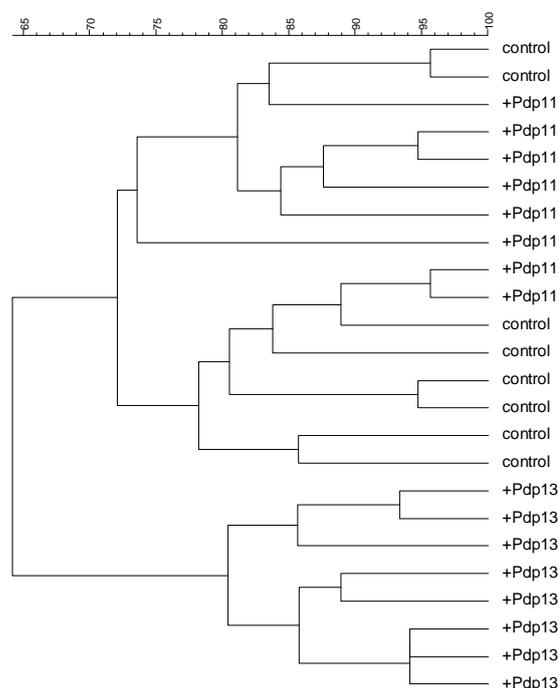


Figura 6. Índices de similitud (DICE) de las bandas de DGGE de intestinos de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control y dietas adicionadas de Pdp11 y Pdp13 liofilizadas.

2.6. Viabilidad del probiótico en pienso

Los resultados de viabilidad de las cepas Pdp11 y Pdp13 incluidas en alginato cálcico mostraron al término del proceso de liofilización una concentración de bacterias cultivables en TSAs entre 2×10^7 y 2×10^5 ufc/g. Esta concentración decreció hasta ser nula a las 48 horas.

Adición de los probióticos *Shewanella* Pdp11 y Pdp13 administrados frescos en preengorde de lenguado (*Solea senegalensis*)

3.1. Características metabólicas de los probióticos ensayados

Se exponen a continuación algunas características metabólicas y bioquímicas de las dos cepas utilizadas (Pdp11 y Pdp13) en las experiencias de alimentación con probióticos. Como se puede observar (Tabla 9), tan sólo encontramos diferencias en el crecimiento en TCBS y hemolisis en Agar Sangre en cuanto es positivo para Pdp13 y tarda más de 72h para Pdp11.

Tabla 9. Características metabólicas de las cepas probióticas Pdp11 y Pdp13

Prueba	Cepa Pdp11	Cepa Pdp13
Tinción Gram	-	-
Catalasa	+	+
Oxidasa	+	+
Movilidad	+	+
ONPG	-	-
Gelatinasa	+	+
Caseinasa	+	+
Lecitinasa	-	-
Lipasa	+	+
Arginina dihidrolasa	-	-
Lisina descarboxilasa	-	-
Ornitina descarboxilasa	-	-
Citrato	+	+
Formación de H ₂ S	+	+
Ureasa	-	-
TDA	-	-
Voges- Proskauer	-	-
Indol	-	-
Crecimiento TCBS	+ (72h)	+
Hemolisis Agar Sangre	+ (72 h)	+
Crecimiento a:		
7°C	+	+
37°C	-	-
Crecimiento en		
0%	+	+
6%	+	+
8%	+	+
Ácido a partir de		
Gluc.	+	+
Man.	-	-
Inos.	-	-
Sorb.	-	-
Rhan	-	-
Sac.	+	+
Mel.	-	-
Amy.	-	-
Arab.	-	-
Sensibilidad O129	+	+

3.2. Capacidad inhibitoria “in vitro” de Pdp11 y Pdp13

Los resultados obtenidos en nuestro estudio con bacterias frescas, liofilizadas, extracto del liofilizado, ECPs y ECPs inactivados por calor se muestran en las Tablas 10 y 11. Como se puede observar la capacidad de inhibición frente a ambos patógenos ensayados (*V. harvey* y *P. damsela* subsp. *piscicida*) fue más intensa con Pdp11 que para Pdp13.

Tabla 10. Capacidad de de inhibición de la cepa Pdp11 frente a *V. harvey* y *P. damsela* subsp. *piscicida*. ++: positivo; +: positivo débil; -: negativo; +/-: resultado negativo o muy débilmente positivo.

	Masa bacteriana	ECPs	ECPs inactivados	Bacterias liofilizada	Extracto del liofilizado
<i>V. harvey</i>	++	+	+/-	+	+
<i>P. damsela</i>	++	++	-	++	++

Tabla 11. Capacidad de de inhibición de la cepa Pdp13 frente a *V. harvey* y *P. damsela* subsp. *piscicida*. ++: positivo; +: positivo débil; -: negativo; +/-: resultado negativo o muy débilmente positivo.

	Masa bacteriana	ECPs	ECPs inactivados	Bacterias liofilizada	Extracto del liofilizado
<i>V. harvey</i>	+	+/-	+/-	+/-	-
<i>P. damsela</i>	-	+	-	+	+

A partir de ambos líofilos se observó el crecimiento de bacterias probióticas, sin embargo no se detectó crecimiento de bacterias a partir de los ECPs o del extracto estéril de los liofilizados.

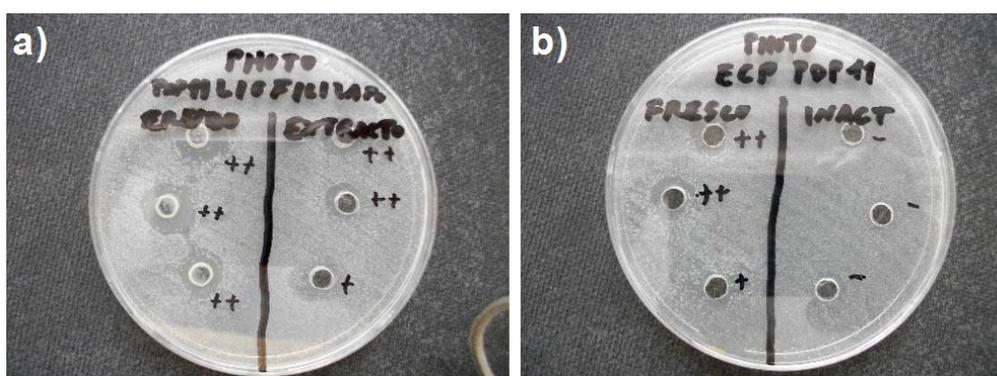


Figura 7. Placas de cultivos con césped de *P. damsela* subsp. *piscicida* donde se aprecian los halos de inhibición producidos por (a) el co-cultivo en pocillos de masa bacteriana liofilizada y extracto estéril del liofilizado de la cepa PDP11; y (b) la adición en pocillos de ECPs de la cepa PDP11. Se puede observar la diferencia entre los resultados obtenidos con los ECPs frescos (izquierda) y los inactivados (derecha).

Cuando los probióticos eran viables (masa bacteriana fresca y masa liofilizada), y por tanto pudieron crecer en las placas de co-cultivos, los halos de inhibición aumentaron significativamente cuando las placas, tras la incubación a 22 °C, se conservaron a 6 °C durante 4 días (Fig. 7). Este efecto se pudo ver sobre todo en los co-cultivos con *V. harveyi*. Lo pocillos que dieron en un principio como negativos continuaron sin producir inhibición.

3.3. Composición bioquímica de Pdp11 y Pdp13

El análisis de proteínas de ambos probióticos, Pdp11 y Pdp13, no mostró diferencias significativas, con valores entre 37,1 g Kg⁻¹ (Pdp11) y 38,8 g Kg⁻¹ (Pdp13.), si bien los niveles de lípidos totales fueron significativamente mayores para Pdp13 (9,17 g Kg⁻¹) frente a Pdp11 (7,89 g Kg⁻¹), como se puede apreciar en la Figura 8.

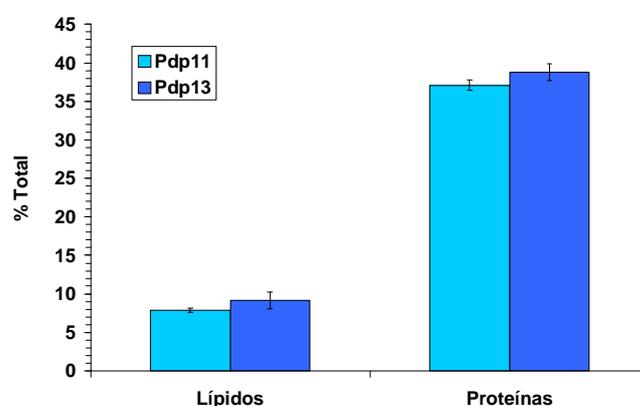


Figura 8. Proteínas y lípidos totales (%) de los probióticos Pdp11 y Pdp13. (Media ± error estándar). Diferentes letras significan diferencias significativas (P<0.05).

En cuanto al perfil de ácidos grasos (%) se observó que el aporte mayoritario de ambas cepas era de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) con valores de 66,9 g Kg⁻¹ para Pdp11 y 62,2 g Kg⁻¹ para Pdp13), presentándose además numerosas diferencias entre ambas cepas (Tabla 12). De especial interés fueron los valores significativamente menores de SAFAs y mayores de MUFAs (27,8 g Kg⁻¹ y 66,9 g Kg⁻¹ respectivamente) de Pdp11 frente a Pdp13 (32,0 g Kg⁻¹ y 62,2 g Kg⁻¹ respectivamente). En cuanto a los ácidos grasos de la serie n-6 y n-9 también se registraron diferencias significativas entre ambos probióticos (0,13 g Kg⁻¹ y 3,92 g Kg⁻¹, Pdp11; 0,07 g Kg⁻¹ y 3,13 g Kg⁻¹, Pdp13)(P<0,05) Si bien los niveles de EPA (2,75 g Kg⁻¹) y ARA (0,05 g Kg⁻¹) fueron similares entre ambas cepas, los relativos a DHA fueron inapreciables para Pdp13, estando en 0,06 g Kg⁻¹ los correspondientes a Pdp13. Resultaron muy llamativas las diferencias significativas detectadas entre ambos probióticos *S. putrefaciens* y *S. baltica* respecto a los ácidos grasos 16:1n-11 (0,08 g Kg⁻¹, Pdp11; 5,26 g Kg⁻¹, Pdp13) y 16:1n-7 (27,3 g Kg⁻¹, Pdp11; 19,7 g Kg⁻¹, Pdp13).

Tabla 12. Perfil de ácidos grasos (%) de las dos cepas (Pdp11 y Pdp13) empleadas.

	Pdp11	Pdp13
14:0	2.10 ± 0.01 ^a	2.21 ± 0.00 ^b
14:1	11.4 ± 0.0 ^a	12.1 ± 0.0 ^b
15:0	11.1 ± 0.0 ^a	16.8 ± 0.0 ^b
16:0	10.7 ± 0.0 ^a	9.3 ± 0.0 ^b
16:1n-11	0.08 ± 0.01 ^a	5.26 ± 0.00 ^b
16:1n-9	1.97 ± 0.00 ^a	1.71 ± 0.00 ^b
16:1n-7	27.3 ± 0.0 ^a	19.7 ± 0.0 ^b
16:1n-5	0.11 ± 0.00	0.12 ± 0.00
17:0	3.50 ± 0.06	3.41 ± 0.02
16:2n-4	1.94 ± 0.00 ^a	2.43 ± 0.01 ^b
17:1	21.3 ± 0.0 ^a	19.8 ± 0.0 ^b
18:0	0.43 ± 0.00 ^a	0.31 ± 0.03 ^b
18:1n-9	1.88 ± 0.02 ^a	1.39 ± 0.01 ^b
18:1n-7	2.56 ± 0.02 ^a	2.16 ± 0.01 ^b
16:4	0.08 ± 0.05	0.09 ± 0.00
18:2n-6	0.07 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^b
18:3n-3	0.04 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.01 ^b
20:1n-11	0.06 ± 0.04	0.02 ± 0.01
20:1n-9	0.03 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.00 ^b
20:1n-7	0.04 ± 0.02 ^a	0.01 ± 0.00 ^b
18:4n-3	0.23 ± 0.01 ^a	0.27 ± 0.01 ^b
20:4n-6	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.00
22:1n-11	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
22:1n-9	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.02
22:1n-7	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
20:4n-3	0.08 ± 0.00 ^a	0.09 ± 0.00 ^b
20:5n-3	2.75 ± 0.02	2.75 ± 0.01
22:5n-3	0.06 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.00 ^b
22:6n-3	0.06 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^b
PUFAs	5.36 ± 0.03 ^a	5.77 ± 0.01 ^b
SAFAs	27.8 ± 0.0 ^a	32.0 ± 0.0 ^b
MUFAs	66.9 ± 0.1 ^a	62.2 ± 0.0 ^b
n-3	3.22 ± 0.03	3.17 ± 0.01
n-6	0.13 ± 0.02 ^a	0.07 ± 0.01 ^b
n-9	3.92 ± 0.02 ^a	3.13 ± 0.03 ^b
n-3 HUFAs	2.95 ± 0.03	2.88 ± 0.01
n-3/n-6	25.9 ± 2.9 ^a	43.6 ± 7.0 ^b
EPA/DHA	44.2 ± 3.7	
ARA/EPA	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
ARA/DHA	0.82 ± 0.07	
DHA/EPA/ARA	0.45 ± 0.04	
MUFAs/ n-3 HUFAs	22.6 ± 0.2 ^a	21.6 ± 0.1 ^b
MUFAs/PUFAs	12.5 ± 0.1 ^a	10.8 ± 0.0 ^b
MUFAs/SAFAs	2.41 ± 0.00 ^a	1.94 ± 0.00 ^b
18:1n-9/ n-3 HUFAs	0.64 ± 0.01 ^a	0.48 ± 0.00 ^b

(Media ± error estándar). Diferentes letras significan diferencias significativas. (P<0,05).

Los resultados obtenidos en los cromatogramas adjuntos (Fig. 9) reflejan un gran número de ácidos grasos de cadena corta y media presentes en ambas cepas probióticas, cuya determinación no fue posible por las características del cromatógrafo y la ausencia de patrones específicos.

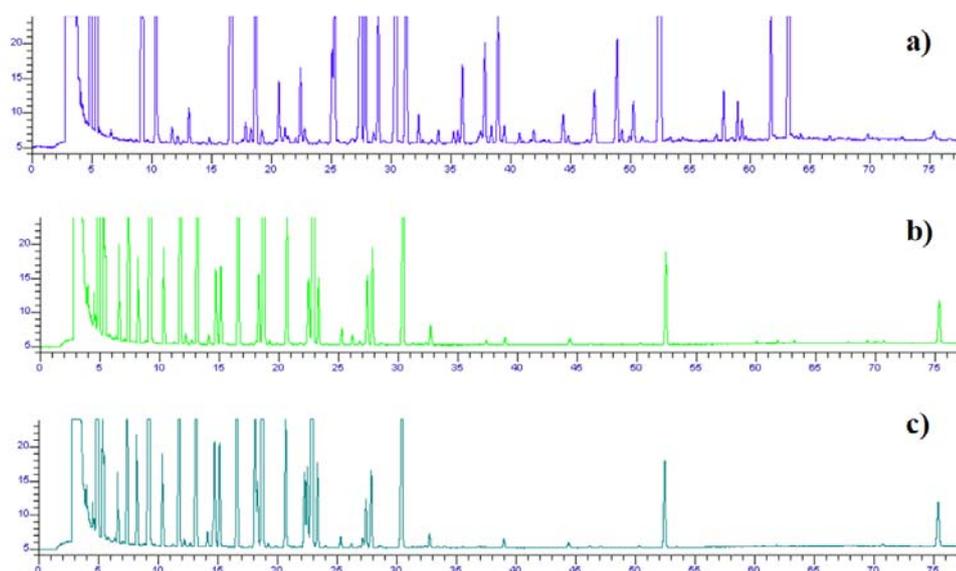


Figura 9. Cromatogramas referentes a los probióticos ensayados frente al pienso control: (a) pienso control, (b) Pdp11, (c) Pdp13.

3.4. Crecimiento de los ejemplares en cultivo

El crecimiento de juveniles de lenguado alimentados durante 60 días con las tres dietas experimentales no mostró diferencias significativas, estando la tasa de crecimiento específico (SGR) entre 1,18-1,25 % (Tabla 13). La supervivencia final registrada fue del 100% para ambos grupos alimentados con dieta probiótica y del 99,6% para los correspondientes al grupo control.

Tabla 13: Crecimiento de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control y dos adicionadas con probióticos frescos (Pdp11 y Pdp13).

	Dieta Control	Dieta Pdp11F	Dieta Pdp13F
Peso inicial (g)	15,0 ± 0,2	15,0 ± 0,0	15,0 ± 0,1
Peso final (g)	33,5 ± 1,1	32,7 ± 2,4	31,8 ± 1,0
Biomasa inicial / tanque (g)	1834 ± 29	1836 ± 1	1829 ± 6
Biomasa final / tanque (g)	4054 ± 182	3978 ± 313	3884 ± 125
Producción neta / tanque (g)	2220 ± 153	2142 ± 312	2055 ± 119
Supervivencia (%)	99,6 ± 0,6	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
SGR (% día-1)	1,25 ± 0,03	1,21 ± 0,11	1,18 ± 0,04

SGR: Tasa específica de crecimiento. (Media ± error estándar). Diferentes letras significan diferencias significativas. $P < 0,05$.

3.5. Estudio de parámetros inmunológicos al término de la experiencia

Los peces alimentados con la dieta adicionada de Pdp13 fresca mostraron un aumento significativo de la actividad antiproteasa en suero, frente a los ejemplares del grupo control. Esta diferencia no fue detectada para los peces que recibieron la dieta adicionada de Pdp11 fresca, como se puede observar en la Figura 10.

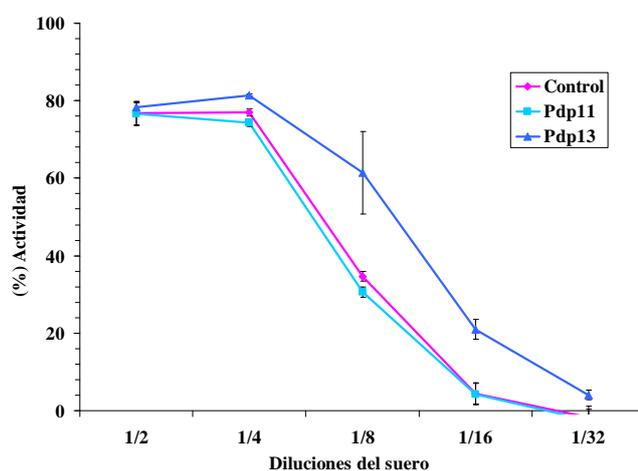


Figura 10. Actividad antiproteasa de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control y dietas adicionadas de Pdp11 y Pdp13 frescas.

En cuanto al título de anticuerpos específicos en suero (ELISA), no se observaron diferencias significativas en los ejemplares alimentados con las diferentes dietas ensayadas ($P < 0,05$), según los resultados que se presentan en la Figura 11.

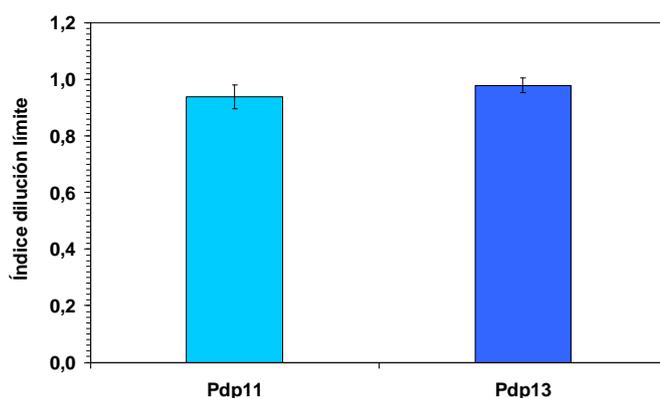


Figura 11. Índice de las diluciones límite (dilución límite tratamiento/dilución límite control) obtenidas mediante ELISA indirecto de sueros de peces alimentados con las dietas probióticas Pdp11 y Pdp13 frescas, utilizando como antígenos bacterias inactivadas de Pdp11 y Pdp13 respectivamente.

3.6. Evolución de la microbiota digestiva y modulación probiótica

La microbiota intestinal analizada mediante el estudio del 16S rDNA (PCR-DGGE) mostró una sucesión a lo largo del tiempo (Fig. 12), estableciéndose 3 *clusters*: el primero correspondiente al inicio de la adición probiótica (24-72h) con un índice de similitud del 10% entre muestras, el segundo relativo a las 2, 3 semanas, con un índice de similitud del 35% y el tercero, referente al término de la experiencia, con un índice del 15%.

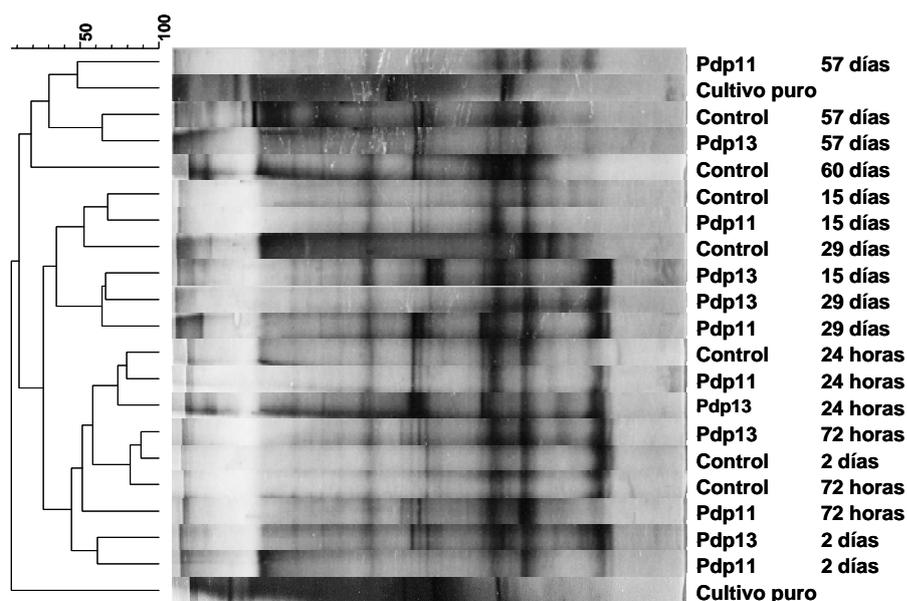


Figura 12. Evolución de la microbiota intestinal de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control y dietas adicionadas de Pdp11 y Pdp13 frescas.

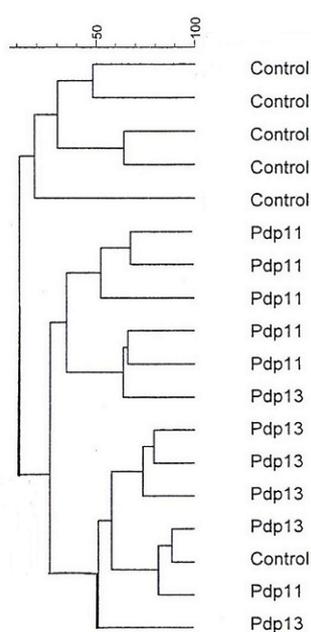


Figura 13. Índices de similitud (Pearson) de las bandas de DGGE de intestinos de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control y dietas adicionadas de Pdp11 y Pdp13 frescas.

Si observamos la microbiota intestinal de los tres grupos experimentales a los 57 días de adición probiótica, podemos observar 3 clusters (Fig 13): el que agrupa la correspondiente a los ejemplares que recibieron la dieta Pdp13 fresco, con un índice de similitud del 50%, otro referente a los alimentados con la dieta Pdp11 fresco, cuyo índice de similitud era del 35% y finalmente el grupo control, con el índice más bajo (18%).

3.7. Estudio histológico de digestivo, hígado y músculo

El análisis histológico de enterocitos mostró menor número de vacuolas grasas en los ejemplares alimentados con la cepa Pdp13 fresca (Fig. 14c), frente a los grupos que recibieron el pienso control (Fig. 14a) o adición de la cepa Pdp11 fresca (Fig. 14b), si bien no a nivel significativo ($P>0,05$). Se detectó gran variabilidad en estos dos últimos grupos de ejemplares.

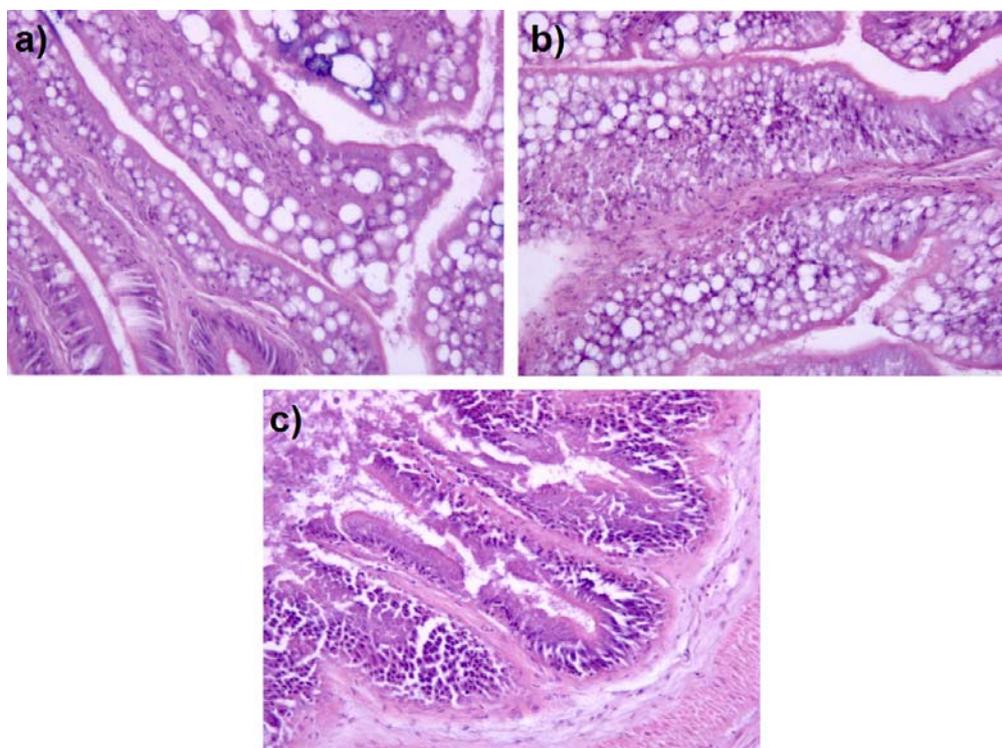


Figura 14. Imágenes al microscopio óptico de vacuolas grasas (400X) en enterocitos de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control (a) y dietas adicionadas de Pdp11 (b) y Pdp13 (c) frescas.

No se observaron diferencias significativas en el músculo de los juveniles alimentados con las tres dietas ensayadas. El examen microscópico de las muestras de hígado no pudo ser concluyente, al detectarse gran variabilidad entre réplicas en todos los especímenes, independientemente de la dieta experimental utilizada.

3.8. Composición corporal de los ejemplares al término de la experiencia

La composición corporal de músculo e hígado de los ejemplares alimentados con las tres dietas experimentales se muestra en la Figura 15. Como se puede observar, no se registraron diferencias significativas en los valores de proteínas entre grupos experimentales en músculo ($88,0-90,9 \text{ g Kg}^{-1}$) o hígado ($30,6-37,7 \text{ g Kg}^{-1}$). Sin embargo, el nivel de lípidos detectado en músculo fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en el grupo control ($7,92 \text{ g Kg}^{-1}$), que en los grupos adicionados de probiótico ($4,92 \text{ g Kg}^{-1}$, Pdp11 fresco; $5,09 \text{ g Kg}^{-1}$, Pdp13 fresco), existiendo una tendencia similar en hígado, aunque no alcanzó un nivel significativo ($P > 0,05$).

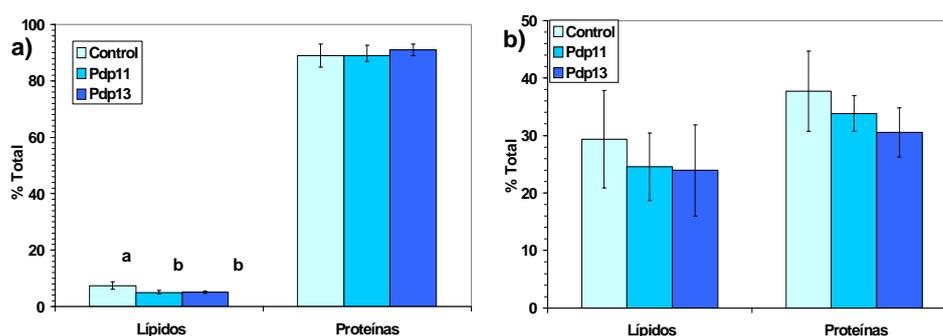


Figura 15. Proteínas y lípidos totales (%) en músculo (a) e hígado (b) de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control y dos adicionadas con probióticos frescos (Pdp11 y Pdp13). (Media \pm error estándar). Diferentes letras significan diferencias significativas ($P < 0,05$).

El perfil de ácidos grasos analizados (%) en músculo e hígado se presenta en las Tablas 15 y 16. En cuanto al primero, no se registraron diferencias significativas entre peces alimentados con las diferentes dietas experimentales respecto a PUFAs, MUFAs, n-3, n-6, n-9, EPA o ARA. En cuanto al DHA, se observó una tendencia de mayores valores en los ejemplares que recibieron ambas cepas probióticas. Por el contrario, se detectaron niveles significativamente menores en ácidos linolénico ($18:3n-3$) y estearidónico ($18:4n-3$) en el músculo de los ejemplares alimentados con Pdp11 ($0,87 \text{ g Kg}^{-1}$ y $0,58 \text{ g Kg}^{-1}$ respectivamente) y Pdp13 frescos ($0,98 \text{ g Kg}^{-1}$ y $0,67 \text{ g Kg}^{-1}$ respectivamente) frente al grupo control ($1,15 \text{ g Kg}^{-1}$ y $0,99 \text{ g Kg}^{-1}$ respectivamente) ($P < 0,05$). Además se obtuvieron niveles significativamente mayores de ácido palmítico ($16:1n-5$) en los especímenes que recibieron Pdp11 ($0,34 \text{ g Kg}^{-1}$) frente a los alimentados con Pdp13 ($0,17 \text{ g Kg}^{-1}$) ($P < 0,05$) y una tendencia a mayores valores con respecto al grupo control ($0,22 \text{ g Kg}^{-1}$), aunque no a nivel significativo ($P > 0,05$).

En el caso del hígado, se observaron menores valores de ácidos grasos de la serie n-3, en los peces alimentados con ambos probióticos. De especial interés los valores significativamente menores del ácido estearidónico ($18:4n-3$) ($P < 0,05$) y menores del ácido $20:4n-3$ ($P > 0,05$) para Pdp11 ($0,26 \text{ g Kg}^{-1}$ y $0,33 \text{ g Kg}^{-1}$ respectivamente) y Pdp13 ($0,22 \text{ g Kg}^{-1}$ y $0,26 \text{ g Kg}^{-1}$ respectivamente) frente a los que recibieron la dieta control ($0,77 \text{ g Kg}^{-1}$ y $0,57 \text{ g Kg}^{-1}$ respectivamente) ($P > 0,05$). Asimismo se determinaron niveles significativamente menores de $16:2n-4$ en los ejemplares alimentados con la dieta Pdp13 fresca ($0,79 \text{ g Kg}^{-1}$), frente a los alimentados con la dieta Pdp11 fresca ($0,94 \text{ g Kg}^{-1}$) ($P < 0,05$).

Tabla 14. Perfil de ácidos grasos (%) en músculo de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control y dos adicionadas con probióticos frescos (Pdp11 y Pdp13).

	Dieta Control	Dieta Pdp11F	Dieta Pdp13F
14:0	3,17 ± 0.78	2,43 ± 0.56	2,21 ± 0.06
14:1	0,12 ± 0.05	0,08 ± 0.02	0,07 ± 0.02
15:0	0,48 ± 0.06	0,41 ± 0.08	0,42 ± 0.03
16:0	17,9 ± 0.7	18,8 ± 0.9	18,1 ± 0.6
16:1n-11	0,24 ± 0.09	0,13 ± 0.03	0,17 ± 0.05
16:1n-9	0,27 ± 0.07	0,15 ± 0.04	0,19 ± 0.06
16:1n-7	3,72 ± 1.07	2,61 ± 0.55	2,70 ± 0.15
16:1n-5	0,22 ± 0.02 ^{ab}	0,34 ± 0.11 ^b	0,17 ± 0.03 ^a
17:0	0,61 ± 0.03	0,65 ± 0.07	0,64 ± 0.08
16:2n-4	0,94 ± 0.07	0,97 ± 0.21	0,87 ± 0.08
17:1	0,31 ± 0.07	0,37 ± 0.14	0,29 ± 0.17
18:0	6,04 ± 1.17	7,08 ± 0.48	7,03 ± 0.42
18:1n-9	9,93 ± 0.71	9,41 ± 0.70	9,63 ± 0.54
18:1n-7	2,51 ± 0.17	2,39 ± 0.10	2,35 ± 0.05
16:4	0,29 ± 0.10	0,39 ± 0.17	0,16 ± 0.07
18:2n-6	5,96 ± 0.71	5,42 ± 0.51	5,55 ± 0.44
18:3n-3	1,15 ± 0.21 ^a	0,87 ± 0.11 ^b	0,98 ± 0.10 ^{ab}
20:1n-11	0,20 ± 0.11	0,12 ± 0.02	0,08 ± 0.03
20:1n-9	0,81 ± 0.14	0,70 ± 0.05	0,66 ± 0.04
20:1n-7	0,21 ± 0.10	0,18 ± 0.07	0,16 ± 0.08
18:4n-3	0,99 ± 0.28 ^a	0,58 ± 0.15 ^b	0,67 ± 0.08 ^{ab}
20:4n-6	1,76 ± 0.32	2,03 ± 0.12	2,04 ± 0.04
22:1n-11	0,70 ± 0.20	0,52 ± 0.07	0,45 ± 0.09
22:1n-9	0,20 ± 0.06	0,11 ± 0.03	0,10 ± 0.08
22:1n-7	0,06 ± 0.03	0,10 ± 0.01	0,06 ± 0.03
20:4n-3	0,52 ± 0.09	0,46 ± 0.05	0,52 ± 0.04
20:5n-3	6,92 ± 0.58	6,22 ± 0.25	7,01 ± 0.54
22:5n-3	8,51 ± 0.37	7,91 ± 0.45	8,62 ± 0.54
22:6n-3	25,3 ± 3.2	28,5 ± 3.2	28,1 ± 0.8
PUFAs	52,3 ± 1.7	53,4 ± 2.6	54,6 ± 1.2
SAFAs	28,2 ± 1.0	29,4 ± 1.2	28,4 ± 1.1
MUFAs	19,5 ± 2.6	17,2 ± 1.6	17,1 ± 0.7
n-3	43,3 ± 1.8	44,6 ± 0.39	45,9 ± 1.3
n-6	7,72 ± 0.45	7,44 ± 0.39	7,58 ± 0.42
n-9	11,2 ± 0.9	10,4 ± 0.8	10,6 ± 0.5
n-3 HUFAs	41,2 ± 2.3	43,1 ± 3.1	44,3 ± 1.4
n-3/n-6	5,64 ± 0.55	6,01 ± 0.65	6,08 ± 0.41
EPA/DHA	0,28 ± 0.05	0,22 ± 0.03	0,25 ± 0.01
ARA/EPA	0,26 ± 0.06	0,33 ± 0.02	0,29 ± 0.02
ARA/DHA	0,07 ± 0.01	0,07 ± 0.00	0,07 ± 0.00
DHA/EPA/ARA	2,11 ± 0.23	2,26 ± 0.18	1,98 ± 0.14
MUFAs/n-3	0,79 ± 0.02	0,81 ± 0.02	0,81 ± 0.01
MUFAs/PUFAs	0,38 ± 0.06	0,32 ± 0.05	0,31 ± 0.02
MUFAs/SAFAs	0,70 ± 0.12	0,58 ± 0.04	0,60 ± 0.03
18:1n-9/ n-3	0,24 ± 0.03	0,22 ± 0.03	0,22 ± 0.02

(Media ± error estándar). Diferentes letras significan diferencias significativas. (P<0,05).

Tabla 15. Perfil de ácidos grasos (%) en hígado de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control y dos adicionadas con probióticos frescos (Pdp11 y Pdp13).

	Dieta Control	Dieta Pdp11F	Dieta Pdp13F
14:0	6,03 ±1.42	7.21 ± 1.23	6.98 ± 0.81
14:1	0,08 ± .05	0.13 ± 0.03	0.11 ± 0.03
15:0	0,65±0.19	0.74 ± 0.15	0.67 ± 0.14
16:0	22,5±6.0	25.2 ± 3.8	25.6 ± 4.1
16:1n-11	0,41±0.08	0.49 ± 0.05	0.46 ± 0.04
16:1n-9	0,95±0.46	1.50 ± 0.35	1.51 ± 0.22
16:1n-7	7,75±0.90	8.78 ± 1.61	8.57 ± 0.64
16:1n-5	0,26±0.12	0.41 ± 0.15	0.28 ± 0.09
17:0	1,65±0.32	1.56 ± 0.26	1.54 ± 0.28
16:2n-4	0,88±0.07 ^{ab}	0.94 ± 0.05 ^a	0.79 ± 0.05 ^b
17:1	0,43±0.16	0.43 ± 0.26	0.52 ± 0.16
18:0	5,36±0.99	5.78 ± 0.68	6.88 ± 0.96
18:1n-9	13,8±1.4	16.2 ± 2.7	17.8 ± 4.4
18:1n-7	4,42±0.41	5.19 ± 0.73	5.11 ± 0.37
16:4	0,24 ±0.09	0.13 ± 0.04	0.11 ± 0.05
18:2n-6	9,66±2.43	8.26 ± 2.31	7.80 ± 1.11
18:3n-3	1,98±0.63	1.34 ± 0.76	1.12 ± 0.38
20:1n-11	0,06±0.02	0.07 ± 0.06	0.05 ± 0.03
20:1n-9	0,77±0.03	0.91 ± 0.15	0.87 ± 0.12
20:1n-7	0,39±0.14	0.39 ± 0.22	0.42 ± 0.04
18:4n-3	0,77±0.10 ^a	0.26 ± 0.09 ^b	0.22 ± 0.08 ^b
20:4n-6	1,68±0.43	1.25 ± 0.49	1.18 ± 0.30
22:1n-11	0,67±0.07	0.82 ± 0.12	0.64 ± 0.17
22:1n-9	0,22±0.08	0.21 ± 0.08	0.21 ± 0.06
22:1n-7	0,06±0.02	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.03
20:4n-3	0,57±0.16	0.33 ± 0.11	0.26 ± 0.09
20:5n-3	2,44±0.86	1.76 ± 1.06	1.33 ± 0.53
22:5n-3	6,20±2.18	3.40 ± 0.97	3.39 ± 0.69
22:6n-3	9,07±3.15	5.76 ± 2.07	5.36 ± 2.04
PUFAs	33,5±11.7	23.8 ± 8.8	21.7 ± 8.3
SAFAs	36,2±8.8	40.5 ± 5.7	41.6 ± 5.5
MUFAs	30,3±3.3	35.7 ± 6.5	36.7 ± 5.2
n-3	20,9±9.0	13.0 ± 8.7	11.8 ± 6.9
n-6	11,3±2.8	9.5 ± 2.9	9.0 ± 1.4
n-9	15,7±1.7	18.9 ± 3.6	20.4 ± 4.6
n-3 HUFAs	18,3±8.2	11.2 ± 4.6	10.3 ± 6.3
n-3/n-6	1,78±0.47	1.25 ± 0.57	1.26 ± 0.51
EPA/DHA	0,29±0.07	0.34 ± 0.11	0.27 ± 0.07
ARA/EPA	0,72±0.16	0.76 ± 0.12	0.92 ± 0.14
ARA/DHA	0,21±0.08	0.27 ± 0.12	0.25 ± 0.07
DHA/EPA/ARA	2,24±0.65	2.83 ± 1.25	3.48 ± 1.19
MUFAs/-3 HUFAs	0,53±0.07	0.43 ± 0.12	0.45 ± 0.09
MUFAs/PUFAs	1,06±0.61	1.95 ± 0.84	1.89 ± 0.74
MUFAs/SAFAs	0,86±0.14	0.88 ± 0.08	0.89 ± 0.15
18:1n-9 / n-3 HUFAs	0.95 ± 0.40	2.47 ± 1.20	2.22 ± 0.89

(Media ± error estándar). Diferentes letras significan diferencias significativas. (P<0,05).

3.9. Viabilidad del probiótico en pienso

Los ensayos de viabilidad de los probióticos Pdp11 y Pdp13 fresco adicionados con alginato en el pienso mostraron una caída de viabilidad de 0 a 3 órdenes de magnitud. Los títulos de bacterias cultivables se mantuvieron estables durante al menos dos semanas, observándose dispersiones altas en el caso del Pdp11.

Modulación del estado fisiológico e inmunológico de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*) alimentados con dietas adicionadas del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 fresco y liofilizado durante el preengorde

4.1. Resistencia frente a infección experimental con *P. damsela* subsp. *piscicida*

La mortalidad acumulada obtenida en la infección experimental (ip) con *P. damsela* subsp *piscicida*. Lgh41/01 realizada a los quince días de adición probiótica se muestra en la Figura 16. Todas las mortalidades de los grupos experimentales fueron causadas por el patógeno ensayado, como se demostró a partir de cultivo de riñón, hígado y bazo y posterior confirmación con el test Mono-Pp (Bionor). Los ejemplares alimentados con Pdp11 fresco mostraron un RPS (Porcentaje relativo de supervivencia) de un 21,4% mientras que los grupos Pdp11 liofilizado o alginato fueron similares al control. El proceso comenzaba al día 4-5 después de la inoculación del patógeno, estabilizándose a los 10 días en todos los grupos experimentales.

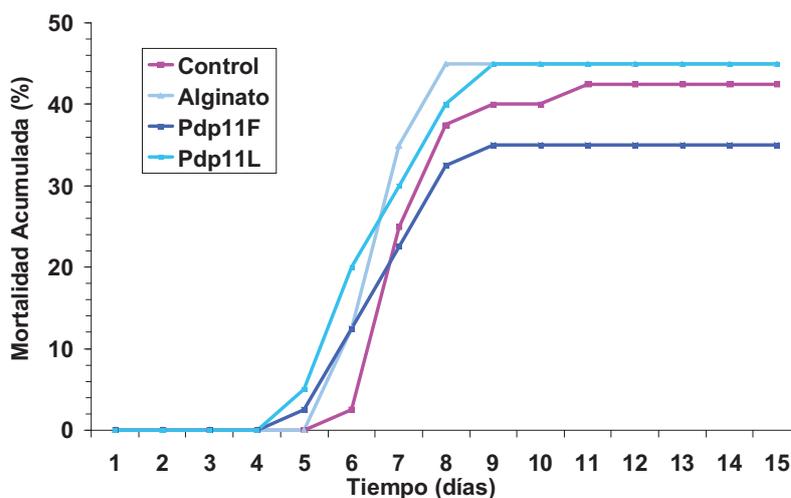


Figura 16: Mortalidad acumulada (%) en juveniles de *S. senegalensis* alimentados con cuatro dietas diferentes tras infección experimental (i.p.) con *P. damsela* subsp *piscicida*

4.2. Estudio de parámetros inmunológicos al término de la experiencia

La actividad lisozima ensayada en sueros de los ejemplares alimentados con las cuatro dietas (Pdp11 fresco, liofilizado, control y alginato) mostró una gran dispersión en cualquiera de los momentos de análisis (Fig. 18), por lo que no se detectaron diferencias significativas entre dietas.

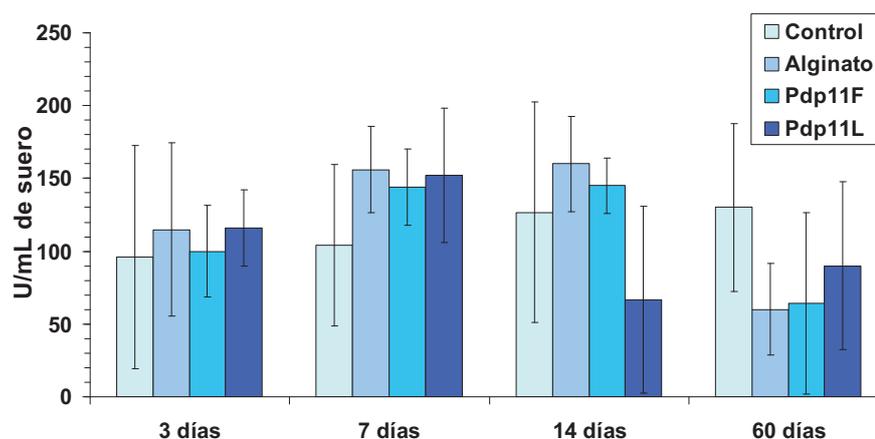


Figura 17. Actividad lisozima (en Unidades/min por cada mL de suero) detectada en sueros de peces alimentados con la cepa Pdp11 fresca, liofilizada frente al control y control-alginato durante 3, 7, 14 y 60 días.

En cuanto al título de anticuerpos específicos frente a la cepa Pdp11 e inmunoglobulinas totales en suero (ELISA), no se observaron diferencias significativas en los ejemplares alimentados con las diferentes dietas ensayadas ($P < 0,05$), según los resultados que se presentan en las Figuras 18 y 19.

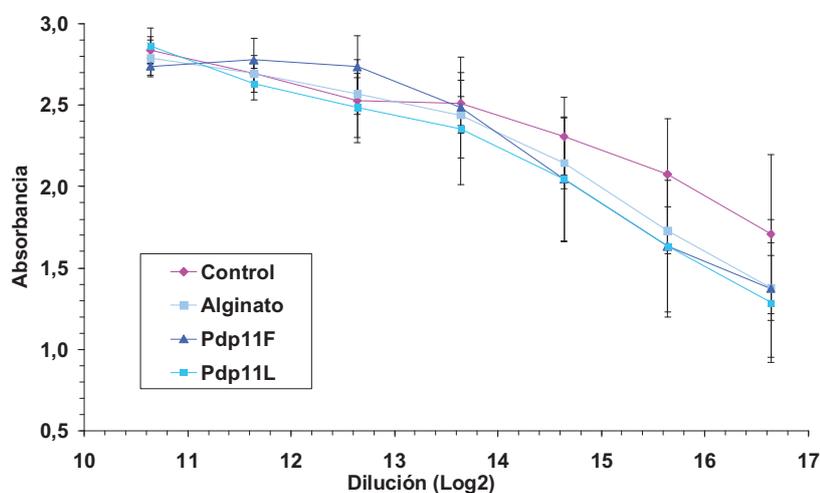


Figura 18. Valores de absorbancia obtenidos con distintas diluciones de sueros de lenguados mediante la técnica ELISA, utilizando como antígeno bacterina de la cepa Pdp11 y suero de lenguados con dieta con Pdp11 fresco, liofilizado, control y control-alginato.

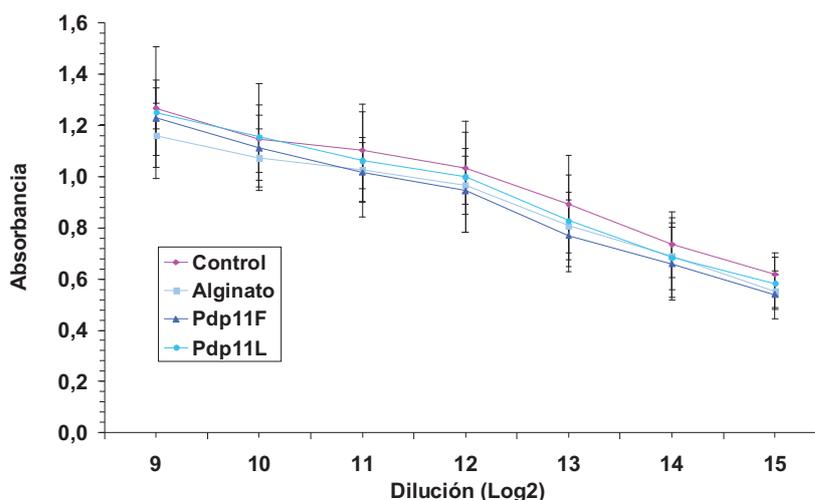


Figura 19. Medida de inmunoglobulinas totales en sueros de lenguados mediante la técnica ELISA, utilizando distintas diluciones de suero de lenguados con dieta Pdp11 fresco, liofilizado, control y control-alginato.

La concentración de proteínas determinada en sueros de los ejemplares alimentados con las cuatro dietas experimentales (Pdp11 fresco, liofilizado, control y alginato) mostró una gran dispersión a lo largo del tiempo de estudio (Fig. 20). Sin embargo, a día 7 se observaron valores significativamente mayores en suero de juveniles que recibieron la dietas Pdp11 liofilizado (74,4 mg/ml) frente a la dieta control (44,9 mg/ml). Las dietas alginato y Pdp11 frescos presentaron valores mayores (81,1 mg/ml, alginato; 83,8mg/ml, Pdp11 fresco) aunque no a nivel significativo ($P > 0,05$).

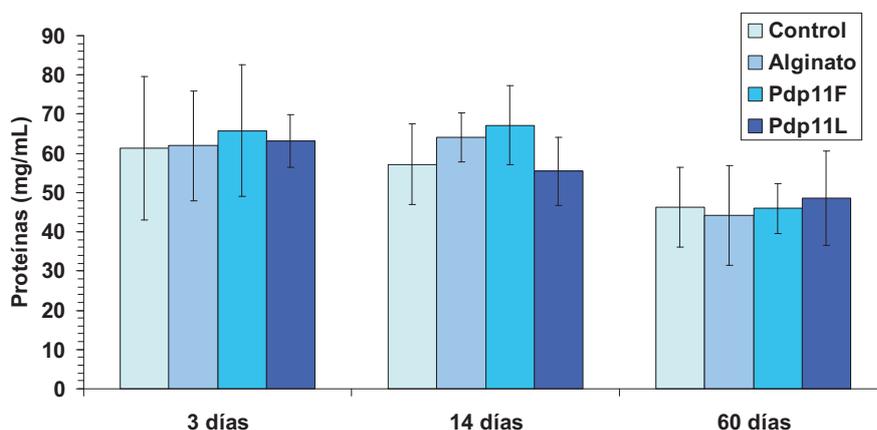


Figura 20. Medida de proteínas en suero de lenguados alimentados con dieta Pdp11 fresco, liofilizado, control y control-alginato.

No se han observado diferencias en proteínas inmunogénicas (Western-Blot) entre los peces alimentados con las diferentes dietas a lo largo de la experiencia (30 y 60 días). Como se muestra en las figuras 21 y 22, no se detectaron bandas nítidamente reactivas al utilizar el suero de peces alimentados con el probiótico (fresco y

líoilizado), frente a los resultados obtenidos con ambos controles. En la figura 23, se observa el gel de electroforesis teñido con azul de Comassie, apreciándose la existencia de bandas proteicas en los distintos preparados de ECPs y OMPs procedentes de la cepa Pdp11.

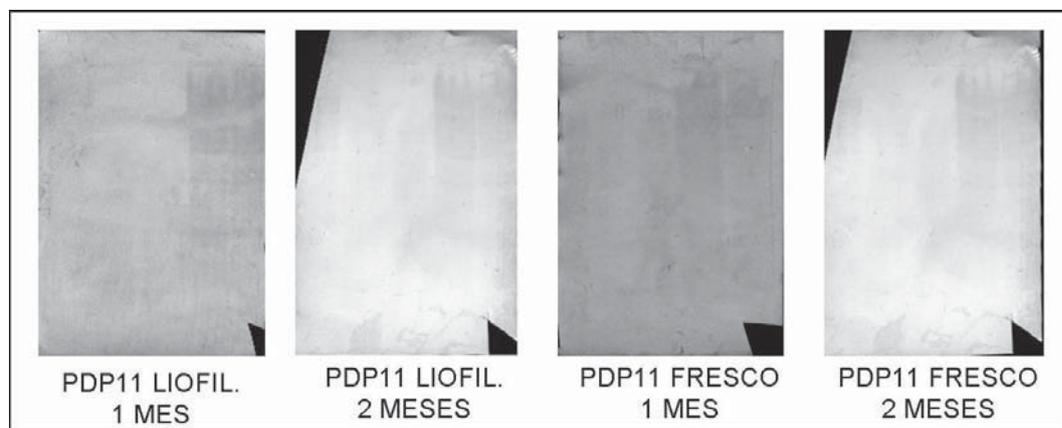


Figura 21. Western Blot de ECPs y OMPs incubados frente a sueros de peces alimentados con dietas Pdp11 liofilizado o fresco durante uno o dos meses.

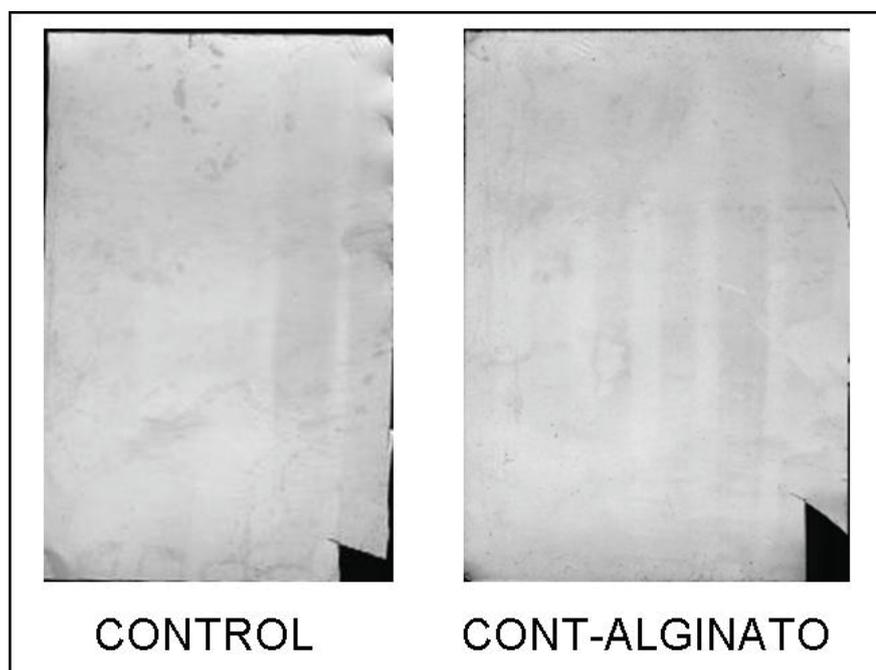


Figura 22. Western Blot de ECPs y OMPs incubados frente a sueros de peces alimentados con dietas Control y Control alginato durante dos meses.

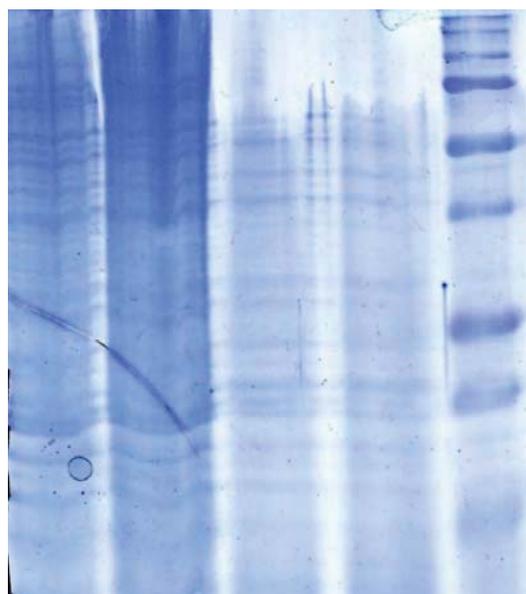


Figura 23. Gel de electroforesis teñida con azul de Comassie. De izquierda a derecha se pueden observar las siguientes bandas: 1 y 2 ECPs, 3 y 4 OMPs, 5 patrón de peso molecular.

Estos resultados sugieren que la adición probiótica de Pdp11, fresco o liofilizado, en pienso no produce una respuesta humoral específica. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que dicha estimulación sea local, a nivel de la mucosa digestiva.

4.3. Crecimiento de los ejemplares en cultivo

El crecimiento de los ejemplares alimentados con las cuatro dietas ensayadas durante dos meses se presenta en la Tabla 17. Las tasas de crecimiento (SGR) registradas estuvieron entre 1,09-1,28, no observándose diferencias significativas ($P < 0,05$). La supervivencia fue del 100% en todos los grupos, excepto en el alimentado con Pdp11 fresco, que fue del 98,6%.

Tabla 16: Crecimiento de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con cuatro dietas experimentales (Pdp11F: Pdp11 fresco; Pdp11L: y Pdp11 liofilizado)

	Control	Alginato	Pdp11F	Pdp11L
Peso inicial (g)	9,8 ± 0,2	10,1 ± 0,1	10,6 ± 0,5	11,0 ± 0,6
Peso final (g)	21,4 ± 1,4	19,9 ± 0,8	20,2 ± 1,1	21,3 ± 1,2
Biomasa inicial / tanque (g)	1367 ± 22	1420 ± 20	1477 ± 71	1535 ± 86
Biomasa final / tanque (g)	2993 ± 190	2780 ± 116	2791 ± 91	2986 ± 170
Producción neta / tanque (g)	1626 ± 167	1360 ± 97	1314 ± 20	1451 ± 84
Supervivencia (%)	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	98,6 ± 2,0	100,0 ± 0,0
SGR (% día ⁻¹)	1,28 ± 0,08	1,10 ± 0,05	1,07 ± 0,01	1,09 ± 0,00

SGR: Tasa específica de crecimiento. (Media ± error estándar). Diferentes letras significan diferencias significativas. $P < 0,05$).

4.4. Estudio de parámetros metabólicos al finalizar la experiencia

Los resultados de los análisis de metabolitos en plasma, hígado y músculo se presentan en las Tablas 18, 19 y 20. Se observaron niveles significativamente mayores de glucosa (5,1 $\mu\text{mol/g}$), lactato (0,83 $\mu\text{mol/g}$) y triglicéridos (14,6 $\mu\text{mol/g}$) en plasma ($P < 0.05$) para los ejemplares alimentados con la dieta *S. putrefaciens* Pdp11 fresco, frente al control (3,8 $\mu\text{mol/g}$; 0,66 $\mu\text{mol/g}$; 11,2 $\mu\text{mol/g}$). Además los peces alimentados con ambas dietas probióticas (Pdp11 fresco y liofilizado), registraron valores significativamente mayores de glucosa, aminoácidos y lactato en músculo y de triglicéridos y glucógeno en hígado. Estos últimos alcanzaron niveles de especial relevancia en las dietas probióticas ensayadas (215,7 $\mu\text{mol/g}$, Pdp11 fresco; 174,8 $\mu\text{mol/g}$, Pdp11 liofilizado), frente al grupo control (122 $\mu\text{mol/g}$) y control alginato (130,5 $\mu\text{mol/g}$).

Tabla 17: Metabolitos en plasma de juveniles de *S. Senegalensis* alimentados con cuatro dietas experimentales (Pdp11F: Pdp11 fresco; Pdp11L: Pdp11 liofilizado) durante dos meses.

Grupo	Control	Pdp11F	Pdp11L
Glucosa (mM)	3,8 \pm 0,3 ^b	5,1 \pm 0,3 ^a	4,0 \pm 0,3 ^b
Lactato (mM)	0,66 \pm 0,04 ^b	0,83 \pm 0,05 ^a	0,77 \pm 0,05 ^{a,b}
Proteínas (mg/mL)	43,4 \pm 1,4	39,0 \pm 0,9	41,9 \pm 1,6
Aminoácidos (mM)	19,1 \pm 0,9	17,4 \pm 1,0	20,1 \pm 1,1
ÁcidosGrasos (mM)	0,50 \pm 0,07	0,54 \pm 0,07	0,54 \pm 0,10
Triglicéridos (mM)	11,2 \pm 0,7 ^b	14,6 \pm 0,9 ^a	12,5 \pm 0,8 ^{a,b}

Tabla 18. Metabolitos en hígado de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con cuatro dietas experimentales (Pdp11F: Pdp11 fresco; Pdp11L: Pdp11 liofilizado) durante dos meses.

Grupo	Control	Alginato	Pdp11F	Pdp11L
Glucógeno ($\mu\text{mol/g}$)	122,0 \pm 6,3 ^c	130,5 \pm 6,7 ^c	215,7 \pm 7,9 ^a	174,8 \pm 8,2 ^b
Glucosa ($\mu\text{mol/g}$)	17,7 \pm 2,3	14,0 \pm 5,7	11,6 \pm 1,2	9,2 \pm 1,4
Triglicéridos ($\mu\text{mol/g}$)	10,0 \pm 0,4 ^c	10,4 \pm 0,4 ^{b,c}	13,2 \pm 0,8 ^a	12,9 \pm 0,8 ^{a,b}
Aminoácidos ($\mu\text{mol/g}$)	28,6 \pm 1,7	27,3 \pm 2,2	22,4 \pm 1,5	23,2 \pm 1,2

Tabla 19. Metabolitos en músculo de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con cuatro dietas experimentales (Pdp11F: Pdp11 fresco; Pdp11L: Pdp11 liofilizado) durante dos meses.

Grupo	Control	Alginato	Pdp11F	Pdp11L
Glucógeno ($\mu\text{mol/g}$)	0,63 \pm 0,18	0,72 \pm 0,16	0,68 \pm 0,15	0,60 \pm 0,12
Glucosa ($\mu\text{mol/g}$)	0,79 \pm 0,17 ^a	0,87 \pm 0,22 ^a	1,21 \pm 0,16 ^b	1,79 \pm 0,11 ^c
Aminoácidos ($\mu\text{mol/g}$)	122,0 \pm 8,1 ^c	130,8 \pm 6,0 ^{b,c}	170,8 \pm 9,0 ^a	157,2 \pm 9,2 ^{a,b}
Triglicéridos ($\mu\text{mol/g}$)	0,89 \pm 0,05	0,95 \pm 0,04	0,99 \pm 0,06	0,95 \pm 0,06
Lactato ($\mu\text{mol/g}$)	33,3 \pm 1,5 ^b	31,8 \pm 1,2 ^b	40,6 \pm 1,9 ^a	40,2 \pm 1,6 ^a

4.5. Evolución de la microbiota digestiva

El análisis de la microbiota digestiva (DGGE) tras dos meses de suministro de probiótico mostró una homogeneidad significativamente superior ($P < 0,05$) en los juveniles alimentados con la dieta Pdp11 liofilizado (100%) y gran homogeneidad en los ejemplares que recibieron la dieta control alginato (95%) y Pdp11 fresco (80%). Sin embargo, se observó una menor similitud (60%) entre ejemplares que recibieron la dieta control (Fig. 24).

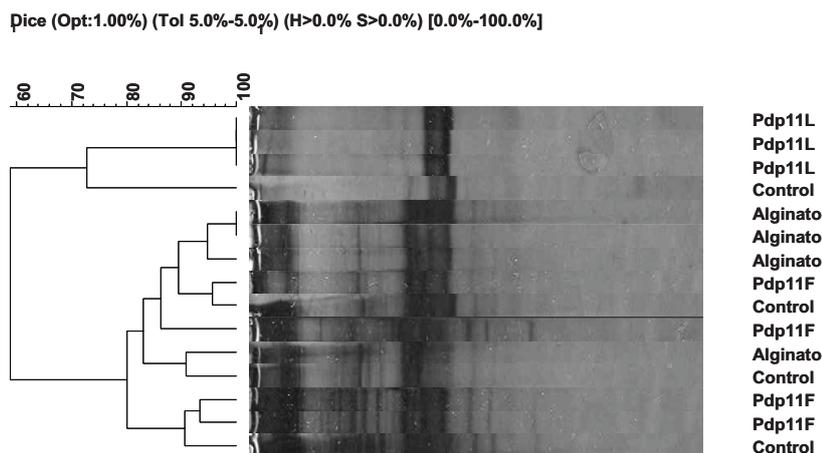


Figura 24. Patrones de bandas de microbiota digestiva (DGGE) de juveniles de *S. Senegalensis* alimentados con cuatro dietas experimentales (Pdp11F: Pdp11 fresco; Pdp11L: Pdp11 liofilizado) durante dos meses.

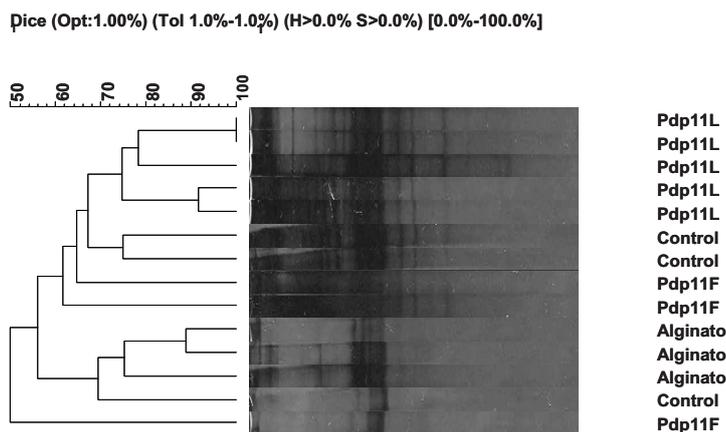


Figura 25. Patrones de bandas de microbiota digestiva (DGGE) de juveniles de *S. senegalensis* alimentados durante dos meses con cuatro dietas experimentales (Pdp11F: Pdp11 fresco; Pdp11L: Pdp11 liofilizado), tras un mes de interrupción del suministro probiótico.

El análisis de la microbiota digestiva (DGGE) tras un mes de interrupción del suministro de probiótico mostró una reducción en la homogeneidad inicial entre ejemplares, con valores del 75% para los juveniles alimentados con las dietas con Pdp11 liofilizado y alginato y del 50% para los que recibieron las dietas con Pdp11 fresco y control (Fig. 25).

4.6. Estudio histológico de hígado y músculo

El examen microscópico de las muestras de hígado reflejó gran número de vacuolas grasas en más del 75% de las muestras examinadas (Figura 26b), presentando el resto cierto grado de vacuolización (Figura 26a) y, en algunos casos, una vacuolización grasa extrema valorada como esteatosis hepática

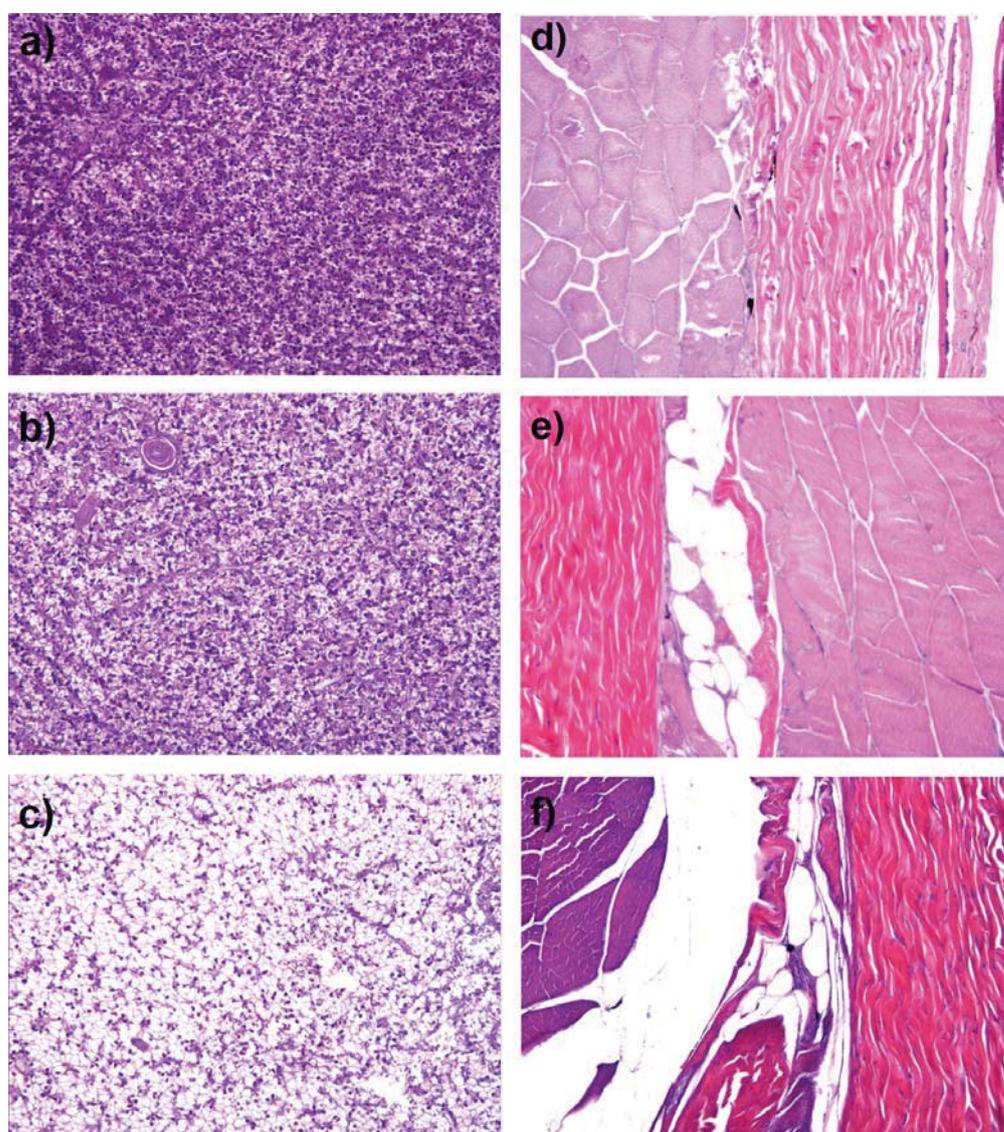


Figura 26. Imágenes al microscopio óptico de vacuolas grasas (400X) en hígado (a-c) y músculo (d-f) de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con cuatro dietas experimentales (control, control-alginato, Pdp11 fresco y Pdp11 liofilizado).

(Figura 26c). No se encontró relación entre el depósito lipídico y la dieta suministrada a los ejemplares.

En cuanto al examen microscópico del músculo se observaron diferente grado de vacuolización lipídica (Fig. 26d,e,f). Estos depósitos se detectaron en todos los casos debajo de la piel y/o penetrando entre las fascias musculares. En ninguna de las muestras aparecieron vacuolas lipídicas en el interior de las fibras musculares. No se pudo establecer una relación entre los depósitos grasos y las diferentes dietas suministradas.

4.7. Composición corporal de los ejemplares al término de la experiencia

La composición corporal de músculo de los peces alimentados con las cuatro dietas experimentales (Fig. 27) no mostró diferencias significativas. Los valores medios de proteínas estuvieron alrededor de 67,6-72,8 g Kg⁻¹ y los de lípidos totales entre 10,0-16,6 g Kg⁻¹.

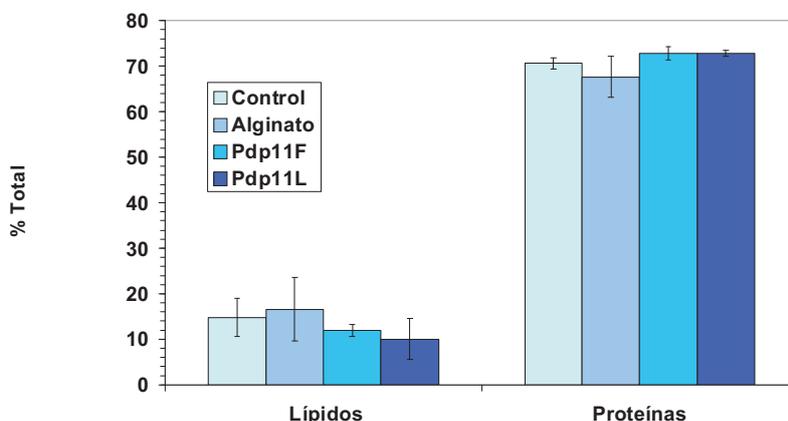


Figura 27. Proteínas y lípidos totales (%) en músculo de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con cuatro dietas experimentales (Pdp11F: Pdp11 fresco; Pdp11L: Pdp11 liofilizado) (Media \pm error estándar). Diferentes letras significan diferencias significativas ($P < 0.05$).

4.8. Composición bioquímica (proteínas, lípidos y perfil de ácidos grasos) de las dietas utilizadas.

Los valores de proteínas en las cuatro dietas utilizadas en esta experiencia fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) para el pienso control y el adición de Pdp11 fresco, frente al que incorporaba alginato ó el Pdp11 liofilizado. Una tendencia similar fue observada respecto a los lípidos totales, aunque no a nivel significativo.

En relación al perfil de ácidos grasos (%) no se registraron diferencias significativas entre piensos, respecto a PUFAs, MUFAs, n-3, n-9, DHA, EPA o ARA, como se muestra en la Tabla 20. Tan sólo se detectaron valores significativamente mayores en ácido linolénico (18:3n-3) para el pienso adición de Pdp11 fresco (1,22%) frente a todos los demás (1,20%). Asimismo, se observaron valores significativamente mayores de ácidos grasos de la serie n-6 para el pienso con incorporación de alginato (7,31%) frente al control (7,26%).

Tabla 20. Perfil de ácidos grasos (%) en pienso comercial control y adicionado de alginato, probiótico (*S.putrefaciens* Pdp11) fresco y liofilizado (Media \pm error estándar, P<0.05).

	Control	Alginato	Pdp11L	Pdp11F
14:0	6.57 \pm 0.19	6.81 \pm 0.08	6.71 \pm 0.39	6.75 \pm 0.03
14:1	0.24 \pm 0.01	0.27 \pm 0.03	0.25 \pm 0.01	0.25 \pm 0.01
15:0	0.52 \pm 0.01	0.51 \pm 0.01	0.54 \pm 0.03	0.52 \pm 0.01
16:0	19.0 \pm 0.3	19.6 \pm 0.1	19.3 \pm 0.6	19.3 \pm 0.0
16:1n-11	0.38 \pm 0.02	0.36 \pm 0.02	0.36 \pm 0.04	0.35 \pm 0.04
16:1n-9	0.23 \pm 0.01	0.24 \pm 0.01	0.24 \pm 0.03	0.20 \pm 0.01
16:1n-7	7.80 \pm 0.12	7.92 \pm 0.07	7.87 \pm 0.28	7.87 \pm 0.02
16:1n-5	0.25 \pm 0.01	0.26 \pm 0.02	0.27 \pm 0.01	0.28 \pm 0.03
17:0	1.09 \pm 0.01	1.08 \pm 0.06	1.17 \pm 0.07	1.17 \pm 0.07
16:2n-4	1.12 \pm 0.03	1.15 \pm 0.02	1.13 \pm 0.02	1.13 \pm 0.02
17:1	0.33 \pm 0.02	0.34 \pm 0.02	0.35 \pm 0.02	0.36 \pm 0.02
18:0	4.53 \pm 0.03	4.55 \pm 0.04	4.51 \pm 0.04	4.52 \pm 0.09
18:1n-9	11.9 \pm 0.1	11.9 \pm 0.0	11.9 \pm 0.1	11.9 \pm 0.1
18:1n-7	3.04 \pm 0.02	3.02 \pm 0.03	3.05 \pm 0.07	3.08 \pm 0.02
18:2n-6	6.15 \pm 0.00	6.23 \pm 0.03	6.17 \pm 0.05	6.19 \pm 0.02
18:3n-3		1.20 \pm		
	1.20 \pm 0.00 ^b	0.01 ^b	1.20 \pm 0.01 ^b	1.22 \pm 0.01 ^a
20:1n-11	0.32 \pm 0.03	0.24 \pm 0.06	0.24 \pm 0.06	0.28 \pm 0.01
20:1n-9	1.55 \pm 0.04	1.47 \pm 0.01	1.49 \pm 0.07	1.46 \pm 0.01
20:1n-7	0.26 \pm 0.03	0.23 \pm 0.00	0.24 \pm 0.02	0.23 \pm 0.00
18:4n-3	2.13 \pm 0.01	2.12 \pm 0.02	2.13 \pm 0.02	2.12 \pm 0.03
20:4n-6	1.11 \pm 0.01	1.08 \pm 0.02	1.09 \pm 0.04	1.10 \pm 0.01
22:1n-11	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
22:1n-9	1.82 \pm 0.04	1.70 \pm 0.03	1.73 \pm 0.14	1.73 \pm 0.03
22:1n-7	0.21 \pm 0.00	0.27 \pm 0.07	0.22 \pm 0.03	0.22 \pm 0.02
20:4n-3	0.69 \pm 0.02	0.67 \pm 0.01	0.67 \pm 0.03	0.66 \pm 0.00
20:5n-3	15.3 \pm 0.2	15.0 \pm 0.0	15.2 \pm 0.4	15.2 \pm 0.1
22:5n-3	1.80 \pm 0.06	1.79 \pm 0.03	1.77 \pm 0.11	1.82 \pm 0.04
22:6n-3	10.2 \pm 0.3	9.81 \pm 0.11	10.0 \pm 0.6	9.89 \pm 0.10
PUFAs	39.9 \pm 0.6	39.3 \pm 0.1	39.6 \pm 1.2	39.6 \pm 0.1
SAFAs	31.8 \pm 0.5	32.5 \pm 0.2	32.3 \pm 1.0	32.3 \pm 0.1
MUFAs	28.4 \pm 0.1	28.2 \pm 0.1	28.2 \pm 0.1	28.2 \pm 0.0
n-3	31.3 \pm 0.6	30.6 \pm 0.2	31.0 \pm 1.2	30.9 \pm 0.1
n-6		7.31 \pm	7.26 \pm	7.29 \pm
	7.26 \pm 0.01 ^b	0.01 ^a	0.04 ^{a,b}	0.03 ^{a,b}
n-9	15,5 \pm 0,1	15,3 \pm 0,0	15,3 \pm 0,1	15,3 \pm 0,1
n-3 HUFAs	28.0 \pm 0.6	27.3 \pm 0.2	27.6 \pm 1.2	27.6 \pm 0.1
n-3/n-6	4.31 \pm 0.07	4.19 \pm 0.03	4.27 \pm 0.17	4.24 \pm 0.01
EPA/DHA	1.50 \pm 0.02	1.53 \pm 0.02	1.52 \pm 0.05	1.54 \pm 0.02
ARA/EPA	0.07 \pm 0.00	0.07 \pm 0.00	0.07 \pm 0.00	0.07 \pm 0.00
ARA/DHA	0.11 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00
DHA/EPA/ARA	0.60 \pm 0.01	0.61 \pm 0.01	0.60 \pm 0.01	0.59 \pm 0.01
MUFAs/ n-3		1.03 \pm 0.01		
HUFAs	1.01 \pm 0.03		1.02 \pm 0.05	1.02 \pm 0.00
MUFAs/PUFAs	0.71 \pm 0.01	0.72 \pm 0.00	0.71 \pm 0.02	0.71 \pm 0.00
MUFAs/SAFAs	0.89 \pm 0.01	0.87 \pm 0.01	0.87 \pm 0.02	0.87 \pm 0.00
18:1n-9 / n-3 HUFAs	0.43 \pm 0.01	0.43 \pm 0.00	0.43 \pm 0.02	0.43 \pm 0.00

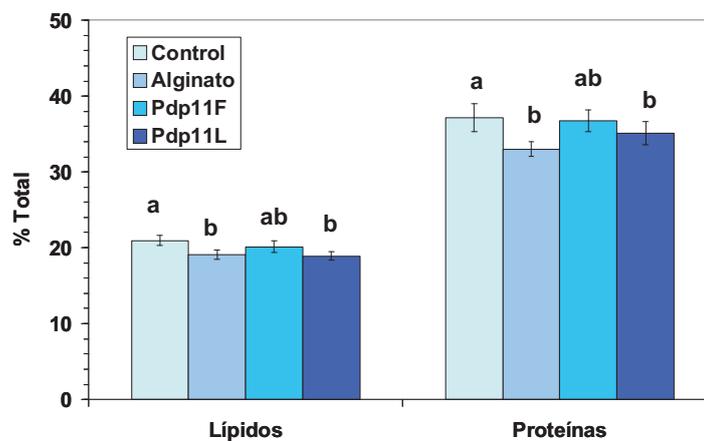


Figura 28. Proteínas y lípidos totales (%) en las cuatro dietas experimentales (Pdp11F: Pdp11 fresco; Pdp11L: Pdp11 liofilizado). (Media \pm error estándar). Diferentes letras significan diferencias significativas ($P < 0.05$).

4.9. Actividades enzimáticas en la cepa Pdp11

Los resultados de las actividades enzimáticas ensayadas (VITEK) se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21. Actividades enzimáticas de la cepa Pdp11

Análisis	Abreviatura	Actividad	Cantidad/ pocillo
Ala-Fe-Pro-ARILAMIDASA	APPA	+	0.0384 mg
ADONITOL	ADO	-	0.1875 mg
L-Pirrolidonal-ARILAMIDASA	PyrA	(-)	0.018 mg
L-ARABITOL	IARL	-	0.3 mg
D-CELOBIOSA	dCEL	-	0.3 mg
BETA-GALACTOSIDASA	BGAL	-	0.036 mg
PRODUCCIÓN DE H ₂ S	H ₂ S	-	0.0024 mg
BETA-N-ACETIL-GLUCOAMINIDASA	BNAG	+	0.0408 mg
Glutamil Arilamidasas pNA	AGLTp	+	0.0324 mg
D-GLUCOSA	dGLU	-	0.3 mg
GAMMA-GLUTAMIL-TRANSFERASA	GGT	-	0.0228 mg
FERMENTACIÓN/GLUCOSA	OFF	-	0.45 mg
BETA-GLUCOSIDASA	BGLU	-	0.036
D-MALTOSA	dMAL	-	0.3 mg
D-MANITOL	dMAN	-	0.1875 mg
D-MANOSA	dMNE	-	0.3 mg
BETA-XILOSIDASA	BXYL	-	0.0324 mg
BETA-Alanina arilamidasas pNA	BAlap	-	0.0174 mg
L-Prolina-ARILAMIDASA	ProA	+	0.0234 mg
LIPASE	LIP	-	0.0192 mg
PALATINOSA	PLE	-	0.3 mg
Tirosina ARILAMIDASA	TyrA	+	0.0276 mg
UREASA	URE	-	0.15 mg
D-SORBITOL	dSOR	-	0.1875 mg
SACAROSA	SAC	-	0.3 mg
D-TAGATOSA	dTAG	-	0.3 mg
D-TREALOSA	dTRE	-	0.3 mg
CITRATO (SODIO)	CIT	-	0.054 mg
MALONATO	MNT	-	0.15 mg
5-CETO-D-GLUCONATO	5KG	-	0.3 mg
Alcalinización de L-LACTATO	ILATk	-	0.15 mg
ALFA-GLUCOSIDASA	AGLU	-	0.036 mg
Alcalinización de SUCCINATO	SUCT	+	0.15 mg
Beta-N-ACETIL-GALACTOSAMINIDASA	NAGA	-	0.0306 mg
ALFA-GALACTOSIDASA	AGAL	-	0.036 mg
FOSFATASA	PHOS	+	0.0504 mg
Glicina ARILAMIDASA	GlyA	-	0.012 mg
ORNITINA DESCARBOXILASA	ODC	-	0.3 mg
LISINA DESCARBOXILASA	LDC	-	0.15 mg
BASE DESCARBOXILASA	ODEC	NC	NC
Asimilación de L-HISTIDINA	IHISa	-	0.087 mg
COURMARATO	CMT	-	0.126 mg
BETA-GLUCORONIDASA	BGUR	-	0.0378 mg
RESISTENCIA O/129 (comp. vibrio.)	O129R	-	0.0105 mg
Glu-Gly-Arg-ARILAMIDASA	GGAA	+	0.0576 mg
Asimilación de L-MALATO	IMLTa	-	0.042 mg
ELLMAN	ELLM	+	0.03 mg
Asimilación de L-LACTATO	ILATa	-	0.186 mg

DISCUSIÓN

1. Influencia de la alimentación con probióticos sobre el crecimiento de lenguado senegalés en engorde

Los ejemplares de lenguado senegalés que recibieron la dieta con el probiótico Pdp11 incorporado en fresco (**PROBIO 1**) mostraron una tasa de crecimiento específico (SGR) significativamente mayor y una producción neta mayor que los alimentados con la dieta control. Los resultados de crecimiento obtenidos en los peces alimentados con la dieta control fueron semejantes a los de Dias *et al.* (2004) y Gatta *et al.* (2010) para esta misma especie. La dosis de probiótico utilizada (10^9 ufcg⁻¹) fue similar a la empleada por Díaz-Rosales *et al.* (2009), quienes obtuvieron un mayor crecimiento en dorada y en lenguado senegalés. Se han descrito resultados similares con el empleo de otras especies de probióticos en peces marinos (De Schrijver y Ollevier, 2000; Robertson *et al.*, 2000; Tovar-Ramírez *et al.*, 2002; Carnevali *et al.*, 2006) y de agua dulce (Ghosh *et al.*, 2007; Aly *et al.*, 2008b).

Una posible explicación de esta mejora en el crecimiento podría ser que los probióticos producen o estimulan enzimas digestivas (Buts *et al.*, 1999; El-Haroun *et al.*, 2006), que favorecen la utilización del alimento (De Schrijver y Ollevier, 2000). Así, Saenz de Rodrigañez *et al.* (2009) añadiendo la misma dosis de Pdp11 liofilizado, detectaron un efecto estimulador de la enzima leucina aminopeptidasa en el intestino distal en juveniles de lenguado senegalés en cultivo. Trabajos similares con aporte probiótico en dieta han descrito el incremento de la digestibilidad aparente (Lin *et al.*, 2004) y la estimulación de la actividad enzimática de la membrana de los enterocitos en larvas de lubina y en alevines de trucha arco-iris (Tovar-Ramírez *et al.*, 2002; Waché *et al.*, 2006).

En los estudios de adición de probióticos es importante considerar la dosis a la que se realiza la administración en dieta, pues algunos autores han propuesto una relación dosis/efecto (Nikoskelainen *et al.*, 2001). Aunque en la literatura se usan diferentes concentraciones bacterianas (10^6 - 10^{10} ufcg⁻¹), las razones para la elección de la dosis específica no suelen presentarse. La dosis elegida para todas nuestras experiencias (10^9 ufcg⁻¹) fue descrita previamente como beneficiosa para la salud de los ejemplares (Díaz-Rosales, 2006; Díaz-Rosales *et al.*, 2006). Dicha dosis está en el rango de la empleada por gran número de autores (Bogut *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 2000; Aly *et al.*, 2008b; Pieters *et al.*, 2008), y resulta superior a la empleada por otros (Nikoskelainen *et al.*, 2001; Brunt *et al.*, 2007). Es interesante señalar que esta misma cepa liofilizada fue ensayada con éxito en dorada a una dosis menor (10^8 ufcg⁻¹), si bien el protocolo de incorporación al pienso fue diferente al empleado en este primer ensayo (Chabrillón *et al.*, 2006).

Asimismo también resulta interesante evaluar el tiempo de adición probiótica y su efecto en el crecimiento y desarrollo de los ejemplares en cultivo. En este sentido, Carnevalli *et al.* (2006) registraron un aumento del 81% en peso cuando se administró

el probiótico durante 59 días, mientras que tan sólo obtuvieron un aumento del 28% cuando el tratamiento probiótico se redujo a 28 días. Otros autores describieron un efecto combinado de dosis y tiempo de administración probiótica en tilapia, obteniendo un crecimiento mayor con *B. pumilus* a dosis altas (10^{12}) durante un mes o a dosis bajas (10^6) tras 2 meses de adición (Aly *et al.*, 2008b).

Los ejemplares alimentados con la dieta complementada con Pdp11 liofilizado (**PROBIO 2**), presentaron una tasa de crecimiento específico (SGR) similar a los del grupo control, mientras que los que recibieron la dieta con Pdp13 liofilizado, tuvieron un crecimiento significativamente menor. Sin embargo, Sáenz de Rodrigáñez *et al.* (2009) observaron un crecimiento mayor en los especímenes de lenguado alimentados con ambos probióticos liofilizados, a idéntica dosis (10^9 ufcg⁻¹) que la empleada en nuestro ensayo. Una posible explicación de esta diferencia en el crecimiento podría atribuirse a la diferente composición del pienso utilizado, así como a la distinta temperatura de cultivo existente en ambas experiencias. En cuanto a la composición proximal del pienso, según numerosos estudios podría ser más adecuada para el cultivo de lenguado senegalés la utilizada por estos autores (55% proteína/17% lípido), que la empleada en nuestro ensayo (50% proteína/22% lípido) (Rodiles *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2009). De hecho, la mayoría de los actuales piensos comerciales empleados en el engorde de lenguado tienen una composición elevada de proteína y discreta de lípidos, puesto que se ha demostrado que niveles mayores de éstos últimos no apoyan el crecimiento de esta especie (Rodiles *et al.*, 2008). La temperatura de cultivo en el presente estudio fue inferior (16,6 °C) a la utilizada por Saénz de Rodrigáñez *et al.* (2009) (21°C). Esta diferencia en temperatura tuvo influencia en la tasa de crecimiento (SGR) del lenguado senegalés, siendo 0,99% la registrada en el estudio de estos autores y 0,69% la observada en este ensayo, del orden de la detectada en lenguado de California cultivado a 17°C (Badillo-Zapata *et al.*, 2010). Además, la temperatura puede influir en la actividad probiótica, puesto que 21°C está cerca del óptimo para el cultivo de Pdp11 (comm. pers. Moriñigo). Una temperatura de cultivo por debajo de la óptima para los ejemplares en cultivo también podría afectar a la actividad enzimática de los enterocitos, enmascarando la acción del probiótico. Si bien la digestión en los peces se produce con la ayuda de los enzimas secretados a nivel del estómago y el páncreas, es necesario tener en cuenta la acción que ejercen durante este proceso los enzimas exógenos añadidos a través de la dieta (Kuz'mina, 2008). De este modo, el aporte probiótico se podría considerar como una fuente significativa de enzimas que apoya la digestión y el crecimiento de los ejemplares, pero que precisa de unas condiciones de temperatura para ejercer su efecto.

Las tasas de crecimiento específico (SGR) observadas en todos los grupos experimentales del ensayo **PROBIO 3** fueron mayores que las registradas en las dos experiencias previas. La mayor temperatura de cultivo empleada en esta ocasión fue relevante, como demostraron Guerreiro *et al.* (2010) en los trabajos realizados con juveniles de lenguado senegalés cultivados a 16°C y 22°C. Además la mejor calidad del pienso aportado (57% proteína/18% lípido) promovió un mejor desarrollo en todos los ejemplares estudiados. No se registraron diferencias significativas en el crecimiento de los peces alimentados con ambas dietas probióticas, Pdp11 y Pdp13 frescas, frente a los ejemplares del grupo control. Como se ha mencionado anteriormente, estos resultados no coinciden con el mayor crecimiento observado por Sáenz de Rodrigáñez *et al.* (2009) con ambas cepas probióticas liofilizadas

En el ensayo **PROBIO 4** no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de los ejemplares alimentados con las dietas probióticas Pdp11 fresco y liofilizado frente al grupo control. Igualmente la adición de alginato (0,5%), empleada para facilitar la incorporación de las bacterias en el pienso, no produjo efecto alguno en este parámetro. Estos resultados coinciden con los observados por Sáenz de Rodrigáñez *et al.* (2009) en lenguado senegalés y Varela *et al.* (2010) en dorada. Sin embargo, cuando el alginato es utilizado a concentraciones mayores ha influido en un mayor crecimiento de los ejemplares de bacalao Atlántico (Vollstad *et al.*, 2006) y de estuario (*Epinephelus coioides*) (Yeh *et al.*, 2008). Las tasas de crecimiento específico (SGR) fueron similares a las observadas en la experiencia anterior (**PROBIO 3**) y superiores a las obtenidas en **PROBIO 1 y 2**. Estos resultados se pueden relacionar tanto con el empleo de una temperatura más adecuada para el cultivo de esta especie, como con el diferente pienso comercial utilizado, tanto en las materias primas, como en el balance energético proteína/grasa empleados (ver ANEXO).

Resulta interesante señalar que la administración de la misma dosis de Pdp11 que la utilizada en nuestro ensayo a juveniles de dorada, no produjo diferencias en el crecimiento cuando los ejemplares eran cultivados a una densidad media, pero promovió un crecimiento superior a una densidad de cultivo elevada (Varela *et al.*, 2010). En este último caso, además, se obtuvo un aumento de la resistencia frente al estrés en los parámetros metabólicos analizados. Este aspecto resulta especialmente interesante dadas las características de la producción intensiva en acuicultura y será contemplado en una sección específica (**PROBIO 4**) de este trabajo.

En nuestro estudio se observó un mayor crecimiento en los ejemplares de lenguado senegalés cuando Pdp11 fresco fue incorporado en un pienso de elevado contenido lipídico (**PROBIO 1**), registrándose un crecimiento similar en los demás ensayos. El suministro de Pdp13 en dieta no presentó ventaja en este parámetro analizado. Las tasas de crecimiento observadas en las distintas experiencias estuvieron relacionadas con la temperatura de cultivo y la calidad del pienso comercial utilizado. Las diferencias obtenidas entre ensayos y con otros autores podrían ser atribuidas a estos dos parámetros. La mejor calidad del pienso empleado en el ensayo **PROBIO 4** permitió un buen crecimiento en todos los grupos experimentales, aunque los ejemplares que recibieron Pdp11, fresco o liofilizado, presentaron un nivel de metabolitos más adecuado para enfrentar un posible estrés, hecho que será descrito en una sección específica más adelante

2. Influencia de la alimentación con probióticos sobre la composición corporal de lenguado senegalés en engorde

Si bien existen numerosos trabajos que hacen referencia a la protección conferida frente a patógenos o al mayor crecimiento registrado en peces alimentados con dietas probióticas, no son frecuentes aquellos que investigan la posible influencia sobre la composición corporal de los mismos. En el estudio **PROBIO 1**, no se encontraron diferencias significativas en los valores de proteínas y lípidos en músculo e hígado entre los ejemplares alimentados con la dieta control o complementada con Pdp11 fresco. Estos niveles fueron similares a los descritos por otros autores (Hernández y García-García, 2004; Rodiles *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2010) para juveniles de lenguado

senegalés en cultivo. El perfil de ácidos grasos en músculo no mostró diferencias significativas entre los dos grupos estudiados. Un buen indicador del valor nutricional del filete de pescado para el consumo humano es el índice de ácidos grasos n3/n6 (Sargent, 1997; Izquierdo, 2005). En nuestro estudio mostró valores iguales o superiores a los descritos como adecuados en trabajos de evaluación de dietas para el crecimiento, la utilización del alimento y calidad de la carne producida en dorada y lubina (Izquierdo *et al.*, 2005; Montero *et al.*, 2005).

En nuestro estudio **PROBIO 2** se detectaron mayores niveles de proteínas en el músculo de los peces alimentados con ambas dietas probióticas (Pdp11 y Pdp13 liofilizados) frente al grupo control, aunque sólo alcanzaron niveles significativos en los ejemplares que recibieron Pdp13. Otros autores han observado resultados similares incorporando células frescas de *B. subtilis* en la alimentación de peces ornamentales (Ghosh *et al.*, 2007). Sin embargo, Sáenz de Rodrigáñez *et al.* (2009) no detectaron diferencias en el porcentaje de proteínas en ejemplares de lenguado senegalés que habían recibido esta misma complementación probiótica en dieta, pero encontraron niveles superiores de lípidos en músculo de peces alimentados con Pdp13. La diferencia existente entre ambos estudios podría estar relacionada con el distinto pienso utilizado. De este modo, la cepa Pdp13 podría modular el nivel de proteínas en nuestro ensayo, donde el pienso empleado fue de bajo contenido proteico para el lenguado senegalés. Asimismo podría modificar el nivel de lípidos en el estudio de Sáenz de Rodrigáñez (2009) en donde el pienso comercial tuvo un contenido lipídico inferior (15%). Este enriquecimiento en lípidos totales fue observado también por Mazurkiewick *et al.* (2008) en carpa (*Cyprinus carpio*) al suministrar dietas implementadas con *Carnobacterium divergens*. En nuestro ensayo los valores de lípidos detectados en el músculo de los peces alimentados con ambas dietas probióticas mostraron niveles ligeramente mayores a los de la dieta control aunque no a un nivel significativo. En cuanto a la composición corporal del hígado, no se registraron diferencias significativas en los valores de proteínas y de lípidos totales según las dietas suministradas, aunque sí se detectó una tendencia a valores ligeramente menores de proteínas y mayores de lípidos en los peces alimentados con la dieta Pdp13 liofilizada. Los valores de proteínas y lípidos detectados en nuestro estudio para ambos órganos fueron similares a los registrados en el ensayo **PROBIO 1**.

El perfil de ácidos grasos detectado en músculo en este ensayo (**PROBIO 2**) fue similar al observado por Hernández y García (2004) y Rodiles *et al.* (2009a; 2010a). No se observaron diferencias significativas entre los peces del grupo control y los alimentados con Pdp11, registrándose sin embargo valores de ácidos grasos de la serie n-6 significativamente mayores para aquellos ejemplares que recibieron la dieta Pdp13. Esto podría indicar un menor valor nutricional de la carne, porque niveles elevados de (Hernández y García-García, 2004) ácidos grasos de la serie n-6 han sido relacionados con problemas cardíacos (Jouven *et al.*, 2001; Leaf, 2001). A pesar de este incremento en ácidos de la serie n-6 obtenido, el índice n-3/n-6 para el grupo Pdp13 fue superior al encontrado por Hernández y García (2004) y Rodiles *et al.* (2009a; 2010a) y semejante al descrito como adecuado para la dorada y la lubina (Izquierdo *et al.*, 2005; Montero *et al.*, 2005).

En cuanto al perfil de ácidos grasos en hígado, nuestro estudio (**PROBIO 2**) reveló mayores diferencias entre dietas que las observadas en el caso del músculo. No

se detectaron diferencias significativas en los niveles de ácidos grasos de la serie n-3 entre los diferentes grupos experimentales, aunque sí se registraron valores significativamente superiores en los ácidos grasos de las series n-6 y n-9 para los ejemplares alimentados con ambas dietas probióticas liofilizadas. De este modo, el índice n-3/n-6 también se vio afectado, siendo significativamente menor para los peces que recibieron Pdp13. El contenido en ácidos araquidónico (ARA, 20:4n-6) y eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) no se vio influido por la dieta suministrada, a diferencia del correspondiente de ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) que fue significativamente menor para los ejemplares alimentados con la dieta Pdp13 liofilizada. No obstante, esta diferencia no afectó al índice DHA/EPA/ARA existente en el hígado, presentando un balance adecuado de los tres ácidos grasos esenciales (Izquierdo *et al.*, 2005). Los valores del ácido margaroleico (17:1) fueron significativamente menores y los del ácido oleico (18:1n-9) significativamente mayores en los especímenes alimentados con las dos dietas probióticas. Este hecho produjo valores significativamente mayores de MUFAs en el grupo que recibió Pdp13, el cual además presentó más diferencias en ácidos grasos con respecto al control. Se registraron asimismo niveles significativamente superiores en los ácidos linolénico (18:3n-3) y linoleico (18:2n-6) para los juveniles que recibieron ambas dietas probióticas, Pdp11 y Pdp13 liofilizadas. El ácido linoleico está implicado en la síntesis de triglicéridos (TAG) y materiales para la síntesis de lipoproteínas (Sire *et al.*, 1981), por lo que participa en el transporte de ácidos grasos desde el hígado a otros órganos. Este incremento en el transporte podría estar relacionado con la mejor condición histológica observada en el hígado de los especímenes que recibieron Pdp11 en dieta. Asimismo, el ácido linolénico, es un compuesto fundamental tanto para (Sargent *et al.*, 1995) a la regulación del sistema inmune, como para el correcto desarrollo del organismo (Kiron *et al.*, 1995; Calder y Kew, 2002; Harbige, 2003; Ramírez-Santana *et al.*, 2009). Resulta interesante destacar los valores significativamente inferiores en los ácidos estearidónico (18:4n-3) y eicosatetraenoico (20:4n-3) en el hígado de los peces alimentados con ambas dietas probióticas, registrándose también menores contenidos de estos dos ácidos grasos en el músculo, aunque no a nivel significativo. Los menores valores de ambos podrían estar relacionados con el papel precursor que tiene el 20:4n-3 en la síntesis de las prostaglandinas PGE₁. Este hecho coincide con lo observado en ejemplares de dorada alimentados con dietas ricas en aceite de *Echium* sp. por Díaz-López (2010). Decir que las prostaglandinas PGE₁ originadas a partir del 20:4n-3 y del ácido dihomo-gamma-linolénico (20:3n-6), junto con las PGE₃ que derivan del EPA, juegan un papel fundamental en la regulación de numerosos procesos fisiológicos e inmunológicos (Sargent *et al.*, 1995; Balfry y Higgs, 2001; Tocher *et al.*, 2003) (Rodríguez *et al.*, 2009). De hecho, ambos grupos de prostaglandinas (PGE₁ y PGE₃) son producidas por el organismo en respuesta a situaciones de estrés (Sargent *et al.*, 1999a,b). Debido a que sus precursores, el 20:3n-6, el 20:4n-3 y el EPA, compiten con el ARA por los mismos enzimas implicados en la producción de eicosanoides (ciclooxigenasas), su presencia modula los procesos proinflamatorios inducidos por las prostaglandinas derivadas del ARA (PGE₂). Asimismo se ha demostrado en ejemplares de bacalao atlántico (Bell *et al.*, 2006) y de lenguado senegalés (Villalta, 2007) una disminución en la síntesis de prostaglandinas derivadas del ARA (PGE₂) después de haber sido alimentados con aceite de *Echium* sp. Este menor nivel detectado influyó en el caso del lenguado en una mejor pigmentación, asociada a la reducción del estrés durante la etapa de cultivo

larvario (Villalta, 2007). Estos datos pueden tener relación con la mejor respuesta frente al estrés y resistencia frente a patógenos detectada en los juveniles de lenguado senegalés alimentados con Pdp11 fresco y cultivados en condiciones de alta densidad en nuestro centro (datos no publicados). Estos resultados coinciden con los registrados por Varela *et al.* (2010) con la misma cepa probiótica suministrada en dieta de dorada, promoviendo resistencia frente al estrés y aumento del crecimiento en los ejemplares cultivados en condiciones de alta densidad.

Por todo lo expuesto con anterioridad sería interesante en el futuro investigar la influencia que las cepas probióticas ejercen sobre el mantenimiento de la homeostasis de los ejemplares, tanto en las primeras etapas de desarrollo como durante el periodo reproductivo ó en las situaciones de estrés que se dan de forma habitual en la acuicultura.

En el ensayo **PROBIO 3** los mayores niveles de proteínas y menores de lípidos totales de la nueva dieta suministrada (ver ANEXO) tuvieron su reflejo en los correspondientes valores observados en el músculo e hígado de los ejemplares. Así, en esta experiencia el contenido proteico del músculo fue mayor y el contenido lipídico del hígado fue menor en comparación con los observados en los dos anteriores ensayos (**PROBIO 1 y PROBIO 2**), mostrando valores más próximos a los del lenguado senegalés salvaje (Hernández y García-García, 2004). No se detectaron diferencias significativas de proteínas en el músculo y en el hígado de los ejemplares asociadas a la adición probiótica de Pdp11 ó Pdp13 en fresco. Sin embargo, el nivel de lípidos observado en músculo fue significativamente menor en los ejemplares que recibieron ambas cepas probióticas frente al grupo control, existiendo una tendencia similar en el hígado.

Las diferentes materias primas del pienso comercial utilizado (ver ANEXO) en esta experiencia (**PROBIO 3**) influyó sobre el perfil de ácidos grasos en el músculo, incrementando los niveles de PUFAs y ácidos grasos de las series n-3 y n-6 y reduciendo los MUFAs y ácidos grasos de la serie n-9, respecto a los obtenidos en los dos ensayos anteriores. Sin embargo, los valores de DHA, EPA y ARA permanecieron similares a los obtenidos en los ensayos **PROBIO 1 y PROBIO 2**, confirmando la importancia que tienen los mismos para los peces y la necesidad de su conservación. No se registraron diferencias significativas en el músculo de los peces alimentados con las dietas probióticas Pdp11 y Pdp13 fresco en cuanto a los contenidos de la mayor parte de los ácidos grasos (PUFAs, SAFAs, MUFAs y ácidos grasos de las series n-3 y n-6). Tampoco se detectaron diferencias significativas en DHA, EPA o ARA, ácidos grasos esenciales para el adecuado crecimiento y bienestar de los peces marinos, con valores que reflejan una buena calidad del músculo para todos los grupos. Al igual que en el ensayo **PROBIO 2**, se observaron valores significativamente menores de (C18:4n-3) en el músculo de los ejemplares alimentados con Pdp11 con respecto al control. La adición de Pdp13 produjo asimismo valores inferiores de este ácido graso, pero no a un nivel significativo. El ácido estearidónico (C18:4n-3) está relacionado con el ácido eicosatetraenoico (20:4n-3) que es precursor, como fue mencionado con anterioridad, de las prostaglandinas PGE₁, por lo que los menores niveles encontrados podrían estar relacionados con la producción de éstas. Además se obtuvieron niveles significativamente mayores de ácido (16:1n-5) en los especímenes que recibieron Pdp11 frente a los alimentados con Pdp13 siendo en ambos casos superiores al grupo control.

Este ácido graso se encuentra en pequeñas cantidades en organismos marinos (Nelson *et al.*, 2002) y se ha demostrado su relación con la menor incidencia de úlceras en humanos (Pagkalos *et al.*, 2009). En este sentido, podría asociarse a la resistencia frente a patógenos y capacidad de cura de las lesiones en la piel observada en nuestro laboratorio con la administración de Pdp11 fresco a ejemplares de lenguado senegalés cultivado en condiciones de alta densidad (datos no publicados).

En cuanto al perfil de ácidos grasos observado en hígado, la nueva dieta empleada (**PROBIO 3**) produjo una disminución en los niveles de PUFAs y ácidos grasos de la serie n-3, con gran incidencia sobre todo en los ácidos DHA y EPA, esenciales para los peces marinos. Esta dieta que produjo igualmente un descenso en el índice n3/n6, no afectó al índice DHA/EPA/ARA. Asimismo, se registraron valores de SAFAs y ácidos linoleico (C18:2n-6) y linolénico (C18:3n-3) superiores a los observados con la dieta utilizada en las dos primeras experiencias (**PROBIO 1** y **PROBIO 2**). La adición de ambos probióticos frescos en dieta produjo en el hígado de los ejemplares niveles significativamente menores del ácido 18:4n-3 e inferiores del ácido 20:4n-3 con respecto a los que recibieron la dieta control. Esto mismo ocurrió en el caso del músculo, lo que sugiere de nuevo la hipótesis del papel de ambos ácidos grasos en la producción de eicosanoides beneficiosos para los ejemplares en cultivo, como se apuntaba anteriormente (**PROBIO 2**). Resulta relevante el gran número de ácidos grasos de cadena corta y media, láurico (12:0), mirístico (14:0), pentadecanóico (15:0) y palmítico (16:0), presentes en ambas cepas estudiadas (**PROBIO 3**), alguno de los cuales han demostrado propiedades antimicrobianas (Pérez-Gutiérrez, 2005; Pagkalos *et al.*, 2009).

Respecto al análisis bioquímico de las cuatro dietas ensayadas (**PROBIO 4**), los valores de proteínas fueron mayores para el pienso control frente a las otras tres dietas, sólo de modo significativo para las que incorporaron alginato ó Pdp11 liofilizado. Una tendencia similar fue observada respecto a los lípidos totales. Sin embargo al analizar la composición proximal del músculo de los ejemplares, se observaron valores de proteínas ligeramente mayores en los peces que recibieron las dietas probióticas frente a los alimentados con ambas dietas control. Estos valores observados en los ejemplares alimentados con Pdp11 pueden tener relación con la presencia de actividades arilamidasa características de esta cepa, que favorecerían una mayor absorción y digestión proteica de la dieta administrada. Éstos enzimas hidrolizan los aminoácidos terminales en péptidos y polipéptidos participando directamente en la regulación a hormonas y péptidos biológicamente activos en tejidos animales (Ramírez-Expósito *et al.*, 2002). Los niveles de lípidos totales fueron inferiores en los juveniles que recibieron ambas dietas probióticas con relación a los alimentados con las dos dietas control y control alginato. Este menor contenido lípidico en músculo también fue observado en la anterior experiencia (**PROBIO 3**) lo que sugiere la existencia de una posible modulación ejercida por ambos probióticos que ya ha sido descrita por otros autores (Sáenz de Rodrigañez *et al.*, 2009). En cuanto al perfil de ácidos grasos no se observaron diferencias significativas entre las cuatro dietas empleadas en este estudio, si bien se observaron diferencias en los ácidos grasos de cadena media y corta, que no pudieron ser determinados por las limitaciones del cromatógrafo utilizado y la ausencia de patrones adecuados.

En nuestro estudio, se observaron unos valores de proteínas en el músculo de

juveniles de lenguado senegalés asociados a los de las dietas empleadas. No se registraron diferencias significativas en los contenidos proteicos en músculo con la adición probiótica (**PROBIO 1, 3 y 4**). Sin embargo, se detectaron niveles de proteínas mayores cuando el pienso comercial era de alto contenido lipídico y la temperatura de cultivo era baja (**PROBIO 2**), siendo estos valores significativamente diferentes para los ejemplares que recibieron Pdp13. La implementación probiótica no modificó los niveles lipídicos en músculo (**PROBIO 1, 2 y 4**). No obstante, en el ensayo **PROBIO 3**, donde el nivel de proteínas en dieta era elevado, los niveles lipídicos fueron significativamente inferiores en relación a la alimentación con ambos probióticos. El perfil de ácidos grasos obtenido en general mostró valores iguales o superiores a los descritos como adecuados para la calidad de la carne producida en dorada y lubina, observándose menores niveles del índice n-3/n-6 con la adición de Pdp13, sin llegar a afectar al índice DHA/EPA/ARA. Las diferentes materias primas empleadas y su formulación respectiva se ven reflejadas en el perfil de ácidos grasos con mayor intensidad en hígado que en músculo (**PROBIO 2 y 3**) Resultan destacables las diferencias observadas en varios ácidos grasos (18:3n-3, 18:2n-6, 18:4n-3, 20:4n-3 y 16:1n-5) promovidas por el aporte probiótico en dieta y con una relación sobre el bienestar de los ejemplares, como se ha descrito anteriormente. Además, parece interesante la necesidad de investigar más sobre los ácidos grasos de cadena corta y media aportados por ambas cepas y que no han podido ser detectados en este estudio.

3. Influencia de la alimentación con probióticos sobre la condición histológica de lenguado senegalés en engorde

Es conocido el efecto que la adición probiótica “in vitro” produce sobre los enterocitos de los ejemplares en cultivo (Ringo *et al.*, 2007; Salinas *et al.*, 2008b; Ringo *et al.*, 2010), mejorando la absorción y la eficiencia digestiva. La incorporación de Pdp11 liofilizado en dieta (**PROBIO 2**) influyó sobre la cantidad y tamaño de las vacuolas grasas del intestino probablemente a través de su influencia sobre el mecanismo de reaclilación de los lípidos absorbidos. Estos resultados coinciden con los registrados por Sáenz de Rodríguez *et al.* (2009), quienes también observaron un número reducido de depósitos lipídicos dentro de los enterocitos en los ejemplares de lenguado senegalés que habían sido alimentados con una dieta enriquecida con este mismo probiótico. Estos autores encontraron unas microvellosidades más alargadas, numerosas y con los bordes apicales caracterizados por presentar una mayor integridad celular, resultados asimismo registrados por Merrifields *et al.*, (2010b) en trucha arcoiris tras adición probiótica. A pesar de que está clara la mejor funcionalidad de estas células frente a la de aquellas que presentan una mayor acumulación de vacuolas grasas, es necesario continuar las investigaciones para obtener una mayor comprensión de los mecanismos de absorción lipídica. Una de las posibles hipótesis es que dicha mejora puede estar relacionada con la presencia de enzimas lipolíticas en la microbiota intestinal de los peces que fueran capaces de aumentar el tiempo de residencia de los lípidos en el intestino (Koven *et al.*, 1994). Ciertas especies de *Vibrio* y *Shewanella* presentan una actividad lipolítica inespecífica “in vitro” sobre aceites de pescado con altos niveles de PUFAs de la serie n-3 (Ando *et al.*, 2004). La secreción de lipasas no específicas de gran actividad podría mejorar por tanto la eficiencia de absorción de los lípidos desde el intestino, evitando el daño de los enterocitos y la posterior infección

microbiana (Olsen *et al.*, 1999; Olsen *et al.*, 2000). La reducción del depósito lipídico en intestino de juveniles de lenguado senegalés promovido por la adición de Pdp11 en dieta frente al grupo control, no fue observada con la incorporación de Pdp13.

El intestino proximal es considerado el área de máxima absorción lipídica para los teleósteos (Olsen *et al.*, 1999). Es por ello por lo que la fuente lipídica de la dieta puede influir tanto sobre la cantidad y tamaño de vacuolas grasas presentes en los enterocitos como sobre el número de lipoproteínas existentes en sus espacios intercelulares. Niveles elevados de lípidos neutros parecen causar depósitos grasos en los enterocitos de varias especies (Olsen *et al.*, 1999; Caballero *et al.*, 2003) y una excesiva acumulación grasa puede producir cambios funcionales en los mismos (Olsen *et al.*, 2000). Se ha sugerido que este aporte dietético no sólo reduce el metabolismo intracelular y consecuentemente el transporte lipídico a través de la membrana basolateral del enterocito, sino que también puede limitar la absorción de lípidos a través de las microvellosidades. Esta circunstancia explicaría la menor digestibilidad de las dietas que presentan elevados niveles lipídicos (Morais *et al.*, 2006b), como es el caso de la empleada en este ensayo (22%). Igualmente se ha relacionado esta mayor acumulación lipídica con un menor contenido dietético de ácidos grasos de la serie n-3 y el consiguiente desbalance en la síntesis de lipoproteínas (Olsen *et al.*, 1999, 2000). Estudios realizados por Caballero *et al.* (2003) han demostrado que la existencia de una intensa acumulación de vacuolas grasas no parece causar daños patológicos en el epitelio intestinal de ejemplares de dorada alimentadas con dietas de diferentes niveles lipídicos. Otro de los factores importantes a tener en cuenta con respecto a la alteración de la integridad estructural del intestino es la presencia y nivel de fosfolípidos, como componentes que son de las lipoproteínas. En este sentido, Liu *et al.* (2002) y Tocher *et al.* (2008) demostraron que el aporte dietético de fosfolípidos es un factor decisivo para la digestión, la absorción, el metabolismo y el transporte lipídico en peces cultivados, especialmente durante las primeras etapas del desarrollo.

La inclusión de Pdp11 en dieta (**PROBIO 2**) redujo significativamente el tamaño y número de vacuolas grasas en los hepatocitos de juveniles de lenguado senegalés mientras que este efecto no fue observado en aquellos alimentados con la dieta control o la complementada con Pdp13. El hígado es un órgano implicado en numerosas funciones metabólicas: detoxificación, digestión y excreción, siendo fundamental su papel en la asimilación lipídica y el control del aporte graso y de glucógeno. La presencia de alteraciones en la estructura del hígado puede implicar la existencia de daños en su funcionalidad, por lo que éste órgano puede considerarse un buen indicador del estado nutricional y fisiológico del ejemplar en cultivo (Robaina *et al.*, 1997; Caballero *et al.*, 1999). Con el fin de mejorar el crecimiento y ahorrar proteína, se han formulado dietas con niveles lipídicos incrementados, como la empleada en el presente estudio (ver ANEXO). Una de las posibles consecuencias de la utilización de dichas dietas es el aumento de depósitos grasos en el hígado de varias especies (Bell, 1998). Un hígado graso puede ser además la manifestación de una dieta no equilibrada (Robaina *et al.*, 1998; Caballero *et al.*, 1999), una deficiencia en ácidos grasos (Ibeas *et al.*, 1994), un exceso de peroxidación lipídica (Bell *et al.*, 1995) o unas inadecuadas condiciones de cultivo (Blanchard *et al.*, 2008). Por ello, las primeras dietas comerciales empleadas para el engorde del lenguado senegalés, contribuyeron en gran medida a la producción de ejemplares con hígados grasos (Rueda-Jasso *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2010). En nuestro ensayo (**PROBIO 2**), la inclusión de Pdp11 liofilizado en una dieta

muy grasa (22%) supuso una ventaja en la condición del hígado de los ejemplares, asimismo observada en los enterocitos. En ningún caso se observó una repercusión de la dieta en la estructura del músculo, dado que la mayor parte de la deposición de grasa observada en los ejemplares de nuestro estudio se produjo debajo de la piel. Dicha deposición coincide con la registrada para el lenguado senegalés salvaje por Borges *et al.* (2009).

En la actualidad la utilización de dietas con sustitución parcial de aceites de pescado por aceites vegetales han de tener una formulación precisa para evitar estos depósitos grasos en intestino e hígado (Olsen *et al.*, 2003; Morais *et al.*, 2005a), tanto con proporciones de sustitución del 75% (Rodríguez *et al.*, 2002; Francis *et al.*, 2007), como cuando estas son bajas y se acompañan de un inadecuado balance de aminoácidos (Caballero *et al.*, 2003; Menoyo *et al.*, 2004). En nuestro estudio (**PROBIO 3**) la inclusión de Pdp13 fresco en dieta redujo el tamaño y número de vacuolas grasas en los enterocitos de los juveniles de lenguado senegalés, con respecto a los ejemplares que recibieron la dieta control y la suplementada con Pdp11. Estos resultados fueron diferentes a los observados en el anterior ensayo (**PROBIO 2**), en dónde se observó una menor deposición lipídica en el digestivo e hígado de los peces alimentados con Pdp11 liofilizado. Un mayor conocimiento respecto a las materias primas de ambos piensos utilizados podría darnos una hipótesis para las diferencias detectadas con la adición de ambas cepas. En cuanto a la histología del músculo, se observó también una similitud entre ejemplares independientemente de la dieta empleada. Todos los ejemplares presentaron una idéntica estructura muscular a la registrada con un pienso más graso, como fue el de los ensayos **PROBIO 1** y **PROBIO 2**, lo que confirma que el músculo no es una zona de depósito lipídico para el lenguado senegalés (Borges *et al.*, 2009). La influencia de la adición probiótica sobre el hígado y músculo de juveniles de lenguado senegalés no pudo ser evaluada (**PROBIO 4**) debido a la variabilidad encontrada entre muestras de un mismo grupo experimental. Decir tan sólo que el hígado reflejó gran número de vacuolas grasas en más del 75% de las muestras examinadas, presentando el resto cierto grado de vacuolización. También señalar que algunos ejemplares presentaron una vacuolización grasa extrema valorada como esteatosis hepática. Una mayor información del pienso comercial utilizado (Ver ANEXO) es precisa para poder establecer las causas de estos depósitos.

Debido al incremento en la demanda mundial de aceite de pescado por la industria acuícola y a la producción estable de este producto derivada de las capturas pesqueras actuales, existe un gran interés en la inclusión de aceites vegetales como sustitutos parciales de los marinos en acuicultura. Sin embargo, su utilización puede traer consigo un cambio en el balance de los ácidos grasos en el pienso comercial, produciendo alteraciones de la absorción lipídica e incluso afectando los lugares de adhesión bacteriana en el enterocito (Ringo *et al.*, 1998), con el riesgo de una infección posterior. Considerando la mejor condición del digestivo e hígado observada en nuestro estudio en ejemplares de lenguado senegalés alimentados con un pienso de alto contenido lipídico enriquecido con Pdp11 (**PROBIO 2**), así como el diferente perfil de ácidos grasos detectado, relacionado tanto con una mejor absorción de nutrientes, como con una capacidad antimicrobiana, se estima de gran interés su implementación probiótica en dietas comerciales.

4. Influencia de la alimentación con probióticos sobre parámetros metabólicos de lenguado senegalés en engorde

Estudios recientes han demostrado el efecto de la adición probiótica en una mayor tolerancia frente a situaciones de estrés habituales en los procesos de cultivo de peces, clasificación de ejemplares, transporte, etc. (Rollo *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009), existiendo en la actualidad preparados comerciales utilizados en salmónidos (Biomar, 2009; Merrifield *et al.*, 2010a). La adición de Pdp11 fresco en pienso comercial (**PROBIO 4**) promovió niveles significativamente mayores de glucosa, lactato y triglicéridos en juveniles de lenguado senegalés. Además, los peces que recibieron ambas dietas probióticas (Pdp11 fresco o liofilizado) registraron valores significativamente superiores de glucosa y aminoácidos en músculo y de triglicéridos y glucógeno en hígado con respecto a los dos grupos control. Éste último parámetro en hígado alcanzó niveles de especial relevancia en los ejemplares alimentados con las dietas probióticas ensayadas. Los mayores niveles de glucógeno observados indican la existencia de una ventaja en cuanto a la reserva energética de los ejemplares, lo que les proporciona una capacidad de respuesta mejor frente a situaciones de estrés instantáneo. Nuestros resultados coinciden con los de Varela (2008), quien detectó niveles significativamente mayores de glucógeno a nivel hepático y de aminoácidos en músculo en ejemplares de dorada alimentados con Pdp11 liofilizado. Resulta interesante señalar que cuando ambos grupos experimentales fueron sometidos a un estrés por alta densidad se registraron niveles significativamente menores de cortisol en plasma y significativamente mayores de glucógeno, glucosa y triglicéridos en hígado en los ejemplares alimentados con Pdp11 liofilizado (Varela *et al.*, 2010). La administración de Pdp11 modula la respuesta frente al estrés, si bien el mecanismo de acción aún se desconoce. Una producción menor de cortisol desde las glándulas suprarrenales o una modificación en la retirada desde el plasma podrían explicar los menores niveles de cortisol observados en el grupo alimentado con Pdp11 y sometido a un estrés posterior (Varela *et al.*, 2010). Otros autores han demostrado igualmente una reducción de los niveles de cortisol en dorada mediante la adición de bacterias lácticas (*Lactobacillus fructivorans* y *Lactobacillus plantarum*) (Rollo *et al.*, 2006), siendo este efecto también registrado en lubina con la incorporación de *L. delbrueckii delbrueckii* en dieta (Carnevali *et al.*, 2006). Es interesante señalar que en nuestro estudio (**PROBIO 4**) se observa un efecto más intenso a nivel plasmático en el nivel de metabolitos con la administración de Pdp11 en fresco, frente a Pdp11 liofilizado. Esta ventaja se suma a la observada con dicha forma de incorporación probiótica en cuanto a protección frente a infección experimental, descrita más adelante.

5. Influencia de la alimentación con probióticos sobre parámetros inmunológicos de lenguado senegalés en engorde

A pesar de que existe un amplio número de publicaciones científicas en las que se describe un aumento de la resistencia de peces alimentados con probióticos frente a infecciones experimentales (Gatesoupe, 1994; Robertson *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006a), son menos las que estudian a fondo los mecanismos específicos de esa protección. Estudios recientes (Irianto y Austin, 2002) describen un incremento de parámetros celulares, como el número de eritrocitos, linfocitos y macrófagos y aumento

de la actividad lisozima de salmón Atlántico, trucha arco-iris y rodaballo alimentados con diferentes probióticos. Del mismo modo, Villamil *et al.* (2002) evalúan los efectos inmunomoduladores de varias cepas lácticas, encontrando que *L. lactis* viable e inactivado por calor incrementa las funciones inmunitarias de rodaballo, como concentración de lisozima en suero y quimiotaxis de macrófagos de riñón anterior. La respuesta inmune innata en los peces es más importante que la observada en otros grupos animales (Magnadottir, 2006). Una vez detectado un patógeno bacteriano es fagocitado, digerido y destruido en el interior de las células mediante el estallido respiratorio (Secombes, 1996) ó mediante acción enzimática, o de otras sustancias antimicrobianas (Neumann *et al.*, 2001). Además, los macrófagos son capaces de producir lisozimas, que pueden ser estimuladas por lipopolisacáridos bacterianos o por β -glucanos presentes en los hongos (Paulsen *et al.*, 2001).

Estudios previos realizados con los probióticos Pdp11 y Pdp13 demostraron un diferente efecto en la estimulación del sistema inmune, dependiendo del modo de adición de los mismos, frescos ó inactivados (Salinas *et al.*, 2005; Díaz-Rosales, 2006). En el presente estudio se observó un aumento significativo de la actividad antiproteasa en suero de juveniles de lenguado senegalés alimentados con Pdp13 fresco, frente a los del grupo control y a los que recibieron Pdp11 fresco (**PROBIO 3**). Este hecho evidencia de nuevo mecanismos de actuación distintos entre ambas cepas, como fue observado en otros parámetros con anterioridad. Los resultados obtenidos en nuestro ensayo en ejemplares alimentados con Pdp11 incorporado en la dieta, coinciden con los observados por Varela *et al.* (2010) en dorada, mostrando una ausencia de actividad antiproteasa de la cepa. Es interesante resaltar que Brunt *et al.* (2007) tampoco detectaron diferencias de actividad antiproteasa en suero de ejemplares de trucha arco-iris alimentados con *Bacillus* sp. ó *Aeromonas sobria* en dieta, aunque ambas cepas promovieron resistencia frente a diversos patógenos de esta especie.

En la mayoría de los estudios los probióticos son administrados como células vivas (Salinas *et al.*, 2008a; Vendrell *et al.*, 2008). Sin embargo, también se encuentran trabajos en los que los probióticos son incorporados al pienso como células muertas ó inactivadas (Irianto y Austin, 2003; Taoka *et al.*, 2006), como células liofilizadas (Aubin *et al.*, 2005; Merrifield *et al.*, 2011) ó como extractos celulares (Villamil *et al.*, 2003; Abbas *et al.*, 2010). A pesar de que la administración de los probióticos liofilizados ó inactivados por calor sería más práctica a nivel industrial, Panigrahi *et al.* (2005) obtuvieron mejores resultados mediante el empleo de bacterias vivas. En nuestro ensayo **PROBIO 4** se compararon dos formas de administración del probiótico Pdp11 (fresco ó liofilizado) con el fin de seleccionar aquella que presentase la mayor eficacia. No se detectaron diferencias significativas de la actividad lisozima en los ejemplares alimentados con Pdp11, en ninguna de sus formas de adición a pienso, frente a los grupos control y control alginato. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Varela *et al.* (2010) con ejemplares de dorada alimentados con Pdp11 liofilizado, cultivados tanto a baja como a alta densidad. Otros autores (Taoka *et al.*, 2006) detectaron un aumento en la actividad de lisozima de los ejemplares de tilapia alimentados durante 30 días con un pienso complementado con *B. subtilis*, *L. acidophilus*, *C. butyricum* y *S. cerevisiae* en fresco, no así cuando estos probióticos se administraron como células inactivadas por calor. En sus trabajos con trucha arco-iris, Irianto y Austin (2003), utilizaron diferentes probióticos (Cocos Gram + A1-6, *Vibrio fluvialis* A3-47S, *A. hydrophila* A3-51 y *Carnobacterium* BA211) que, en algunos casos

ya a los 7 días de adición en dieta, promovieron la resistencia frente a la furunculosis, además de incrementar los niveles de actividad lisozima, aunque no a un nivel significativo. Los resultados frente a este parámetro son diferentes según las especies en cultivo y el probiótico ensayado. Así, Brunt *et al.* (2007) registraron un aumento significativo de la actividad lisozima en ejemplares de trucha arco-iris tras 15 días de alimentación con *Bacillus sp.*, pero no con *Aeromonas sobria*, aunque ambas cepas promovieron resistencia frente a diversos patógenos. Asimismo Pieters *et al.*, (2008) tras la adición de *A. sobria* en dieta detectaron ausencia de actividad lisozima en suero de trucha arcoiris que sin embargo presentaba una protección frente a infecciones superficiales. Una mayor capacidad de curación de las heridas superficiales ha sido observada en nuestro laboratorio en lenguado senegalés alimentado con un pienso comercial similar al del presente ensayo e incorporado de Pdp11 fresco y cultivado a densidad alta (datos no publicados). Resulta interesante señalar que las respuestas humorales detectadas para Pdp11 (antiproteasa y lisozima) fueron similares a las observadas para los grupos control, a pesar de la protección frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* conferida por esta cepa (**PROBIO 1, 2 y 4**)

La respuesta inmune adaptativa implica componentes celulares como son las inmunoglobulinas, los linfocitos B y T, los neutrófilos, los macrófagos, etc. Asimismo están involucrados factores humorales, como las inmunoglobulinas (Ig) producidas por los linfocitos B. En los teleósteos, el principal anticuerpo descrito es la IgM (Bengtén *et al.*, 2000), aunque se ha detectado IgD en el lenguado japonés (Hirono *et al.*, 2003). En nuestro estudio el título de anticuerpos específicos en suero frente a Pdp11 y Pdp13 fresco (**PROBIO 3**) no presentó diferencias entre los ejemplares alimentados con las diferentes dietas experimentales tras dos meses de adición probiótica. Asimismo no se registraron diferencias a lo largo de la experiencia en anticuerpos específicos e inmunoglobulinas totales (ELISA) en suero de juveniles de lenguado que recibieron ambas formas de administración probiótica, fresca y liofilizada (**PROBIO 4**) Igualmente, otros autores (Irianto y Austin, 2003) no encontraron anticuerpos específicos frente a *A. salmonicida* en el suero de los ejemplares de trucha arcoiris alimentados con diferentes probióticos que, sin embargo, promovieron la resistencia frente a este patógeno. Por el contrario, Pichiatti *et al.* (2007) observaron un aumento de células Ig+ y granulocitos acidófilos en el digestivo de doradas con una alimentación temprana suplementada con *L. fructivorans* y *L. plantarum*. No se detectaron diferencias en las proteínas inmunogénicas (Western-Blot) con relación a la dieta probiótica suministrada (**PROBIO 4**). Estos resultados corroboran los obtenidos en la titulación de anticuerpos (ELISA) y sugieren la ausencia de una respuesta humoral específica con relación al aporte probiótico en dieta. Sin embargo, no es descartable la posibilidad de que dicha estimulación pueda ser local, a nivel de la mucosa digestiva, ya que es allí en dónde se pueden producir interacciones entre las células implicadas con la respuesta inmune y los pocos antígenos que atravesasen la mucosa intestinal.

Con respecto a la concentración de proteínas totales en suero, a pesar de la mayor protección conferida frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* por la cepa Pdp11 fresca (**PROBIO 4**), no se detectaron diferencias significativas a lo largo de la experiencia entre los ejemplares que recibieron Pdp11 fresco ó liofilizado en dieta dado que la proporción relativa y la cantidad total de proteínas en el suero de los peces varían dependiendo del estado nutricional y fisiológico del ejemplar en cultivo y se ven afectadas por la existencia de infecciones, procesos inflamatorios, etc. Los niveles existentes en

los especímenes pueden ser considerados como buenos indicadores de su salud (Grasman *et al.*, 2000). Así, Brunt *et al.* (2007) detectaron un aumento significativo de estos dos parámetros en juveniles de trucha arco-iris alimentados con *Bacillus* sp.. Sin embargo no registraron diferencias significativas cuando los ejemplares eran alimentados con *Aeromonas sobria*, si bien ambas cepas promovieron una mayor resistencia frente a patógenos como *A. salmonicida*, *V. anguillarum* y *V. ordalii*. Igualmente, Taoka *et al.* (2006) no encontraron niveles significativamente diferentes de proteínas totales en el plasma de los ejemplares de tilapia que habían sido alimentados durante 15 días con una mezcla probiótica comercial que, sin embargo, activó diferentes parámetros de inmunidad innata y aumentó la resistencia frente a *E. tarda*. No obstante, 15 días más tarde, estos mismos autores registraron niveles superiores de proteínas totales en plasma en los especímenes que recibieron la dieta probiótica, siendo mayor el aumento con la adición de células vivas que inactivadas (Taoka *et al.*, 2006).

La no existencia de respuesta inmunitaria sérica indicaría la inocuidad de los probióticos ensayados, ampliamente demostrada en los múltiples ensayos realizados, ya que en ningún caso se ha observado mortalidad en los peces alimentados con el probiótico. Sin embargo, conviene estudiar otros parámetros de respuesta inmunitaria diferentes a los ensayados en esta tesis, y muy especialmente todos aquellos relacionados con la respuesta local en el intestino de los peces. En este sentido, se han realizado pruebas dot-blot para la detección de anticuerpos en el mucus intestinal de los lenguados alimentados con Pdp11, no detectándose anticuerpos específicos (com. pers. Arijo). Esto puede deberse a la ausencia de respuesta local frente al probiótico (que corroboraría su inocuidad) o a que los anticuerpos secretores no son capaces de reaccionar con los anti-Ig de lenguado utilizados.

6. Estudio de la influencia de los probióticos sobre la microbiota intestinal de los peces

Son relativamente recientes los estudios que se proponen conocer la relación funcional entre los peces y su microbiota digestiva (Martín-Antonio *et al.*, 2007), a pesar de que ésta juega un papel importante en los procesos nutritivos y digestivos del huésped. Se ha demostrado que la administración probiótica modula la composición de la microbiota intestinal en los peces (Garrido *et al.*, 2005; Gómez y Balcázar, 2008). Inicialmente la mayoría de los trabajos se realizaron empleando las técnicas bacteriológicas convencionales que implican el aislamiento y el cultivo bacteriano en medios selectivos. Dichas técnicas, además de ser laboriosas, no permitían la identificación de todas las cepas presentes en la microbiota intestinal de los peces, debido a que algunas precisan medios de cultivo especiales y algunos géneros como *Vibrio* y *Aeromonas* son complejos en su identificación (Pond *et al.*, 2006). Además, en el presente está aceptado que existen aún muchas especies que no pueden ser cultivables (Spanggaard *et al.*, 2000). Los trabajos que se realizan en la actualidad emplean técnicas que no requieren el cultivo bacteriano, como es el caso de la electroforesis en gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE). Dicha técnica analiza los 16S rDNA bacterianos, permitiendo una visión más completa de la microbiota en estudio (Huber *et al.*, 2004; Brunvold *et al.*, 2007; Fjellheim *et al.*, 2007; McIntosh *et al.*, 2008). Los resultados de DGGE obtenidos en nuestro ensayo **PROBIO 2** sugieren que la

incorporación de los probióticos Pdp11 y Pdp13 liofilizados en dieta influye sobre la microbiota intestinal de los juveniles de lenguado senegalés, promoviendo una más rápida estabilización de la misma. La modulación ejercida dependió de la especie suministrada, siendo el efecto más acusado en el caso de Pdp13, que sin embargo redujo la riqueza específica (Tapia-Paniagua *et al.*, 2009). El número de bandas de PCR-DGGE correspondientes a los grupos bacterianos *Vibrio* y *Shewanella* se incrementaron en los especímenes alimentados con ambas dietas probióticas. Si bien el género *Vibrio* es el que con mayor frecuencia se encuentra en los peces planos (Eddy y Jones, 2002; Sugita y Ito, 2006), *Shewanella* está descrita tanto en ejemplares de lenguado japonés (Satomi *et al.*, 2007) como en ejemplares de lenguado senegalés alimentados con presa viva (Martín-Antonio *et al.*, 2007). Sin embargo, en nuestro ensayo, Pdp11 y Pdp13 no fueron detectadas en las bandas (PCR-DGGE), quizás debido a que su presencia estuviera por debajo del límite de abundancia (1%) preciso para su determinación por ésta técnica.

Dado que los animales acuáticos presentan una microbiota intestinal en interacción constante con el medio que les rodea, existe una fuerte influencia de éste sobre la misma, afectando por lo tanto a la salud de los ejemplares en cultivo. Spanggaard *et al.* (2000) al estudiar la evolución de la microbiota en ejemplares de trucha arcoiris observaron la existencia de una variación sustancial de la misma a lo largo del tiempo, presentando incluso fluctuaciones diarias. Esto hecho indica que la mayor parte de los microorganismos procedentes del agua y del alimento no son autóctonos, sino que están en continuo tránsito dentro del intestino en los ejemplares en cultivo. La caracterización de la microbiota (PCR-DGGE) realizada en nuestro ensayo (**PROBIO 3**) mostró la existencia de una sucesión a lo largo del tiempo. Atendiendo a dicha sucesión temporal se establecieron los siguientes 3 *clusters*: el primero se correspondió con el inicio de la adición probiótica (24-72h), el segundo a las 2, 3 semanas y el tercero coincidente con el término de la experiencia (57 días). En la caracterización de la microbiota intestinal al finalizar la experiencia se establecieron 3 *clusters* correspondientes a los tres grupos experimentales. Los ejemplares de la dieta Pdp13 fresco presentaron el mayor índice de similitud, en menor medida los alimentados con Pdp11 fresco y la mayor variabilidad entre especímenes se encontró en el grupo control. Se observó por tanto una mayor estabilización de la microbiota digestiva en los dos grupos probióticos, con una mayor intensidad en el grupo Pdp13 que en el grupo Pdp11. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el ensayo **PROBIO 2** en el que ambos probióticos se administraron liofilizados. Bogut *et al.* (1998; 2000) registraron un efecto modulador de la microbiota digestiva de especímenes de siluros (*Silurus glanis*) después de tres semanas de adición en dieta de *Enterococcus faecium*. Dicho efecto modulador estuvo además caracterizado por la disminución de patógenos oportunistas en el tracto digestivo de los ejemplares. Asimismo, se ha descrito un descenso en la densidad bacteriana del tracto digestivo ligada a la administración probiótica en siluros (Bogut *et al.*, 2000) y diferentes especies de peces ornamentales (Ghosh *et al.*, 2007). Dicho descenso puede estar relacionado tanto con la mayor presencia del probiótico en el intestino, como con la producción de sustancias inhibitoras por parte del mismo (Gatesoupe, 1997; Moriarty, 1998). Otros autores han descrito un alto nivel de colonización probiótica en el digestivo de lubinas cultivadas (Carnevali *et al.*, 2006) y un aumento del número de probióticos en el digestivo de salmones paralelo a la administración dietética (Robertson *et al.*, 2000). En este último

estudio se observó que la presencia del probiótico en los ejemplares decrecía al interrumpirse su incorporación en la dieta, no pudiéndose aislar las cepas suplementadas al menos 6 días después de cesar su adición. Al igual que en éste caso, en la trucha arcoiris ha sido imposible aislar la cepa probiótica *Carnobacterium* sp. transcurridos 10 días de la interrupción de la adición de la misma a los ejemplares en cultivo (Irianto y Austin, 2003). Las investigaciones anteriormente mencionadas indican que los probióticos para desarrollar su acción no siempre precisan colonizar el tracto digestivo de los peces. En nuestros ensayos **PROBIO 2** y **PROBIO 3** se ha demostrado la influencia que ejercen las dos cepas probióticas (Pdp11 y Pdp13) administradas en fresco ó liofilizadas sobre la microbiota digestiva. Están en curso trabajos de secuenciación que permitirán contrastar la microbiota intestinal de cada grupo experimental y evaluar la modulación ejercida por ambas cepas utilizadas.

El análisis de la microbiota intestinal (PCR-DGGE) realizado en nuestro ensayo **PROBIO 4** mostró una homogeneidad significativamente superior para los juveniles de lenguado senegalés alimentados con pienso enriquecido con Pdp11 liofilizado. Igualmente se detectó una mayor homogeneidad en la microbiota intestinal de los ejemplares que recibieron las dietas con alginato y Pdp11 fresco frente a los peces del grupo control. Es interesante destacar la existencia de una estabilización en la microbiota intestinal a los dos meses del comienzo de la experiencia con ambas formas de administración probiótica. Esto confirma la evolución observada en el ensayo **PROBIO 3** y sugiere el importante papel que los probióticos pueden ejercer en la regulación de la homeostasis de la microbiota intestinal y en la salud de los ejemplares como ha sido señalado por Kubota *et al.* (1970). Transcurrido un mes sin suministro probiótico, se observó una reducción de la homogeneidad entre ejemplares en todos los grupos estudiados, presentando los peces alimentados con Pdp11 liofilizado aún gran similitud en su microbiota digestiva. Estos resultados sugieren un efecto probiótico no ligado a la colonización de la mucosa intestinal, como ha sido observado por otros autores (Robertson *et al.*, 2000; Irianto y Austin, 2003). La alta capacidad inhibitoria “in vitro” de Pdp11 liofilizado frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* (**PROBIO 3**), la mejor condición del hígado y del intestino observada en los ejemplares alimentados con esta cepa (**PROBIO 2**) y su reducida viabilidad en pienso (48 h) sugieren que el efecto probiótico de Pdp11 sobre los ejemplares de lenguado senegalés no se relaciona con su capacidad colonizadora, sino con el aporte de determinadas sustancias inhibitoras ó factores de crecimiento que influyen beneficiosamente sobre la microbiota intestinal.

7. Efecto protector de los probióticos frente a infecciones experimentales con el patógeno *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

La protección conferida por la adición de probióticos en dieta ha sido descrita para diferentes especies de huéspedes y microorganismos (Raida *et al.*, 2003; Rengpipat *et al.*, 2008) e incluso observada con cepas inactivadas o componentes celulares bacterianos (Irianto y Austin, 2003; Abbas *et al.*, 2010). Estudios “in vitro” sugieren que Pdp11 puede ser considerado como un potencial probiótico para peces, dado que inhibe el crecimiento de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Chabrilón *et al.*, 2005b), bacteria que se adhiere al mucus intestinal y a la piel de *S. senegalensis* provocando brotes epidemiológicos muy serios en su cultivo (Arijo *et al.*, 2005a). Además Makridis *et al.* (2008) han descrito un efecto de inhibición “in vitro” frente a *P.*

damselae subsp. *piscicida* y *Vibrio harveyi* de cepas de *Shewanella* sp., aisladas de intestino de lenguados alimentados con presa natural.

Para conocer el grado de protección que confiere el probiótico Pdp11 frente a infecciones experimentales con *P. damsela* susp. *piscicida*, en todos nuestros estudios se utilizó la inyección intraperitoneal. La patogenicidad de una bacteria puede variar dependiendo de la vía de entrada en el ejemplar en cultivo (piel, branquias, tracto gastrointestinal), sin embargo la ruta natural de infección de *P. damsela* subsp. *piscicida* es desconocida por el momento (Nagano *et al.*, 2009). Así, en nuestros estudios se utilizó la inyección intraperitoneal porque es la ruta más habitual para determinar el porcentaje de supervivencia relativo (RPS) cuando se ensayan diferentes estrategias profilácticas seguidas de infección experimental en laboratorio (Acosta *et al.*, 2005; Arijo *et al.*, 2005b; Lin *et al.*, 2006).

Los ejemplares de lenguado senegalés que recibieron el pienso comercial suplementado con Pdp11 en fresco durante dos meses, (**PROBIO 1**) mostraron una buena protección frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*. La dieta probiótica redujo significativamente la mortalidad de los ejemplares, que alcanzaron un porcentaje de supervivencia relativa (RPS) del 43%. Estos valores fueron mayores que los determinados por otros autores (Díaz-Rosales *et al.*, 2009) para esta misma especie, utilizando sin embargo Pdp11 liofilizado. No obstante, Chabrillón *et al.* (2005a) observaron más del 80% de protección en ejemplares de lenguado alimentados con este probiótico y sometidos a infección experimental con *V. harveyi*, patógeno oportunista habitual en las costas del sur de nuestro país. También es cierto que el contenido de probiótico utilizado en el pienso por estos últimos autores, fue mayor que el utilizado en el presente trabajo y que la virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi* no es la misma. Independientemente de esta consideración, el grado de protección conferida por los probióticos podría estar más relacionado con el patógeno que con el propio microorganismo, como también demostraron Robertson *et al.* (2000) con *Carnobacterium* sp. adicionado en dieta a salmón atlántico en condiciones de cohabitación con diferentes patógenos.

La incorporación de Pdp11 y Pdp13 liofilizados en dieta de juveniles de lenguado senegalés durante dos meses presentó una moderada influencia sobre los porcentajes de supervivencia registrados (RPS, 25-35%) tras infección experimental con *P. damsela* subsp. *piscicida*. (**PROBIO 2**). Dichos porcentajes fueron similares a los descritos previamente por Díaz-Rosales *et al.* (2009) en un estudio realizado con otro pienso comercial suplementado de estas mismas cepas liofilizadas y administrado a ejemplares de lenguado senegalés. En este estudio se utilizó alginato cálcico para favorecer la incorporación y conservación de las bacterias en el pienso. Respecto al posible efecto protector del alginato sódico, algunos autores han descrito un incremento en la resistencia frente a patógenos en peces cuando se incorporaba en la dieta (Skjermo *et al.*, 1995; Skjermo y Bergh, 2004; Cheng *et al.*, 2007). Sin embargo, la utilización del alginato sódico a la concentración empleada en nuestra experiencia (0,5%) no produjo protección alguna frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*. Otros autores no han detectado diferencias significativas en parámetros inmunológicos entre peces que recibieron una dieta suplementada con alginato rico en ácido manurónico y ejemplares control (Huttenhuis *et al.*, 2006).

La incorporación de Pdp11 fresco durante 15 días confirió protección en juveniles de lenguado senegalés frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* (**PROBIO 4**), a diferencia de lo observado con Pdp11 liofilizado que quizás precisa de un mayor tiempo de actuación (**PROBIO 2**). El mayor porcentaje de supervivencia registrada (RPS) para Pdp11 en fresco preselecciona esta forma de administración. En este estudio se confirmó que el alginato sódico utilizado no posee un efecto protector significativo frente al patógeno ensayado. Los valores de RPS frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* detectados en este ensayo fueron inferiores a los observados en **PROBIO 1** y **PROBIO 2**. Estos datos pueden ser debidos a la mayor calidad del pienso comercial empleado (ver ANEXO), que presenta una mejor relación proteína / lípido, un adecuado balance (DHA + EPA) y sobre todo un contenido extra de oligoelementos e inmunoestimulantes (no especificados por la casa comercial). Esta mejora en la dieta control redujo la respuesta frente al patógeno de los grupos alimentados con Pdp11.

Los resultados de protección obtenidos en el estudio **PROBIO 1** se asemejan a los registrados por otros autores, que describieron una mayor supervivencia en ejemplares de rodaballo y trucha arco-iris que recibieron dietas suplementadas con bacterias lácticas (Gatesoupe, 1999; Nikoskelainen *et al.*, 2001; Vendrell *et al.*, 2008) y en peces ornamentales y tilapia (*Oreochromis nilótica*) alimentados con diferentes cepas de *Bacillus* (Ghosh *et al.*, 2007; Aly *et al.*, 2008b). El efecto beneficioso producido por las cepas administradas en los ensayos **PROBIO 2** y **PROBIO 4** fue moderado, aunque significativo, dada la virulencia del patógeno ensayado sobre el lenguado senegalés. Dicha virulencia es mucho mayor en esta especie que la detectada en dorada (Díaz-Rosales *et al.*, 2003; Magariños *et al.*, 2003), o la determinada para otros patógenos (Irianto y Austin, 2003; Vaseeharan y Ramasamy, 2003; Brunt *et al.*, 2007; Aly *et al.*, 2008b). Por ello, las RPS registradas en estos últimos ensayos fueron inferiores a las detectadas en ejemplares de trucha arco-iris frente a *Yersinia ruckeri* (Capkin y Altinok, 2009) o *Aeromonas salmonicida* y *Vibrio anguillarum* (Brunt *et al.*, 2007). Igualmente fueron menores a las observadas en juveniles de anguila (*Anguilla anguilla*) ó tilapia (*O. niloticus*) expuestos a *Edwardsiella tarda* (Chang y Liu, 2002; Taoka *et al.*, 2006).

Resulta interesante destacar que la protección conferida frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* en este último ensayo (**PROBIO 4**) se produjo a los 15 días del comienzo de la adición de Pdp11 en dieta. Este menor tiempo de administración fue registrado asimismo eficaz por Chabrillón *et al.* (2006) para dorada. De igual manera fue demostrado operativo frente a infecciones experimentales con diversos patógenos para el salmón Atlántico (Robertson *et al.*, 2000), la anguila (Chang y Liu, 2002), la tilapia (Taoka *et al.*, 2006) y la trucha arco-iris (Balcázar *et al.*, 2006b; Brunt *et al.*, 2007; Pieters *et al.*, 2008). Sin embargo, se observó que un tiempo de adición probiótica menor (7 días) no confería una protección efectiva a los ejemplares de salmón (Robertson *et al.*, 2000). Cuando el tiempo de administración se ampliaba a 30 días, la protección era consistente tanto para el salmón (Robertson *et al.*, 2000) como para la tilapia (Taoka *et al.*, 2006; Aly *et al.*, 2008b), disminuyendo la eficacia después de 60 días (Aly *et al.*, 2008b). Por todo lo anteriormente expuesto, en el cultivo de peces podría ser más oportuno llevar a cabo pulsos de adición probiótica en momentos específicos, como son la metamorfosis, el destete, la clasificación por tamaños, el transporte y también de modo preventivo ante las situaciones que lo aconsejen (Raj *et al.*, 2008).

8. Optimización del método utilizado para la incorporación de los probióticos en los piensos y su posterior administración a los peces -

En nuestro ensayo **PROBIO 1** se observó un recuento del probiótico Pdp11 fresco cultivable en TSAs alrededor de 8×10^6 ufcg⁻¹ tras su incorporación en el pienso y posterior trituración, amasado y peletización del mismo. No se detectaron bacterias cultivables 24 h más tarde, tanto a 4°C como a 20°C. La reducida viabilidad de la cepa Pdp11 detectada en el pienso justificó la implementación de un nuevo método de incorporación del probiótico. En las experiencias posteriores se utilizó alginato cálcico, que permitió una adecuada incorporación de las cepas bacterianas en el pienso.

La incorporación de las dos cepas probióticas (Pdp11 y Pdp13) en fresco con alginato permitió una viabilidad bacteriana en el pienso durante un periodo mínimo de dos semanas (4°C) (**PROBIO 3**). En este proceso se registró una caída en los títulos bacterianos de 2 órdenes de magnitud, hecho que ha sido observado con otras cepas, como *Carnobacterium* sp. (Robertson *et al.*, 2000). La viabilidad obtenida fue similar a la registrada en algunas cepas de *Bacillus* (Irianto y Austin, 2002), y en general fue inferior a la registrada para *B. pumilus*, *B. firmus* y *C. freundii*, tanto a 4°C como a 25°C, (Aly *et al.*, 2008a). De este modo, la dieta probiótica se preparaba cada 15 días, en el laboratorio, conservándose a 4°C hasta su utilización diaria.

Cuando se utilizaron cepas bacterianas liofilizadas (**PROBIO 2**), la concentración de bacterias cultivables en TSAs al término del proceso de liofilización estuvo comprendida entre 2×10^7 y 2×10^5 ufcg⁻¹. Dicha concentración decreció hasta ser nula 48 h después de su incorporación en el pienso, tanto a 4 °C como a 20°C. La reducida viabilidad de las cepas liofilizadas, que sin embargo ha producido efectos beneficiosos en los ejemplares de lenguado senegalés (**PROBIO 2 y 4**) sugiere que los efectos observados tras su adición no estarían relacionados con la colonización del tracto digestivo o su interacción como microorganismo vivo y activo. Por el contrario, dicho efecto estaría más bien relacionado con la existencia de enzimas, nutrientes que complementan la dieta del pez, sustancias inmunoestimulantes que actual localmente o bien la presencia de sustancias antimicrobianas

9. Caracterización bioquímica y enzimática de las cepas utilizadas. Ensayos de inhibición “in vitro frente a patógenos

Respecto a las actividades metabólicas “in vitro” de las dos cepas probióticas parece interesante resaltar la presencia en las mismas de las actividades catalasa y lipasa (**PROBIO 3**). Ambas actividades tienen relación con la prevención de la peroxidación lipídica y la absorción de lípidos respectivamente, características éstas que podrían contribuir al mantenimiento de una adecuada estructura celular e implementar el metabolismo de los ejemplares en cultivo (Ando *et al.*, 1992; Koven *et al.*, 1994). Además Pdp11 presenta un número significativo de diferentes actividades arilamidasa, características de esta cepa, que parecen promover una mayor absorción y digestión proteica de la dieta administrada (**PROBIO 4**). Resaltar que estas enzimas hidrolizan los aminoácidos terminales en péptidos y polipéptidos participando directamente en la regulación a hormonas y péptidos biológicamente activos en tejidos animales (Ramírez-Expósito *et al.*, 2002).

En cuanto a la capacidad inhibitoria “in vitro” frente a patógenos de lenguaje, se encontraron diferencias entre ambas cepas (**PROBIO 3**). En este sentido, Pdp11, tanto en fresco como en sus productos extracelulares (ECPs), presentó una respuesta positiva frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*, inhibiéndose esta respuesta cuando los ECPs fueron inactivados por calor. Este hecho demostró el carácter termolábil de las sustancias inhibitoras frente al patógeno, lo que no supuso descartar en los ECPs la presencia de bacteriocinas. Asimismo se produjo inhibición frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* con la cepa Pdp11 liofilizada y con su extracto, lo que indicó la actuación no sólo de las bacterias que permanecen viables en el liofilizado, sino también la de sustancias inhibitoras presentes en dicho líofilo. La respuesta de Pdp13 frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* fue, sin embargo, menor que para Pdp11. Pdp13 presentó una intensidad débil o nula tanto con la cepa fresca, liofilizada o los ECPs y ECPs inactivados. También frente al patógeno *V. harveyi* Pdp11 mostró mayor inhibición que Pdp13 en todos los casos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Chabrillón *et al.* (2003) y sugieren la selección de Pdp11 como la mejor candidata para su futura utilización probiótica. Añadir asimismo que la capacidad inhibitoria “in vitro” frente a patógenos ha sido descrita por diferentes autores en distintas cepas de *Bacillus* sp., en las que se aislaron compuestos volátiles (Yilmaz *et al.*, 2006) y polipéptidos de carácter antibiótico activos frente a una gran variedad de bacterias Gram + y Gram- (Morikawa *et al.*, 1993).

Respecto a los análisis bioquímicos de Pdp11 y Pdp13 realizados en este ensayo (**PROBIO 3**) se observó una composición proximal similar en proteínas, aunque Pdp13 presentó un nivel significativamente mayor de lípidos en comparación con Pdp11. En cuanto al perfil de ácidos grasos, ambas cepas probióticas presentaron un alto contenido de MUFAs (>62,0%), sobre todo de los ácidos grasos miristoleico (14:1), palmitoleico (16:1n-7) y margaroleico (17:1). Resulta interesante observar que si bien Pdp11 tuvo los niveles mayores de MUFAs, no fue así en el caso del ácido 16:1n-11, dado que Pdp13 alcanzó valores 65 veces superiores a los obtenidos en Pdp11. Esta diferencia detectada precisa un mayor estudio, pues se ha descrito una mayor resistencia a pH ácido (pH 2) por *Lactobacillus casei* ATCC 334. relacionada con elevados niveles de algunos ácidos grasos similares, como C_{16:1n(9)}, (Broadbent *et al.*, 2010). Esta característica puede ser de enorme interés en cuanto a favorecer la actividad bacteriana en el tracto gastrointestinal de los ejemplares. Además estos autores registraron niveles elevados de histidina intracelular que relacionaron por primera vez con la resistencia bacteriana a condiciones de pH ácido. Dado que este aminoácido esencial es un precursor de la histamina, podría tener además una función de mantenimiento de los tejidos más saludable. Los contenidos en PUFAs fueron bajos (aprox. 5,6%), siendo el nivel de EPA y ARA similar en ambos probióticos, aunque sólo Pdp11 presentó contenido en DHA. Otras diferencias registradas entre ambas cepas fueron el menor contenido de los ácidos grasos linoléico (18:2n-6) y linolénico (18:3n-3) y el mayor de ácido pentadecanoico (15:0) en Pdp13 frente a Pdp11. Ambas cepas presentaron un nivel importante de SAFAs (>28%), especialmente los de cadena corta y media, láurico (12:0), mirístico (14:0), pentadecanóico (15:0) y palmítico (16:0), de alguno de los cuales se han descrito propiedades antimicrobianas (Pérez-Gutiérrez, 2005; Pagkalos *et al.*, 2009). Resaltar que Pérez-Gutiérrez (2005) detectó la presencia de diferentes ácidos grasos de cadena corta y media con propiedades antimicrobianas (esteárico 18:0, linolénico 18:3n-3, margárico 17:0 y láurico 12:0 entre otros) en *Tubifex tubifex*,

oligoqueto habitual de aguas con abundante materia orgánica en descomposición. Asimismo, esta autora determinó que los ácidos grasos demostrados más activos frente contra microorganismos GRAM+ y GRAM- fueron el ácido esteárico y el ácido linolénico. Decir que en nuestros ensayos no fue posible la determinación del contenido en ácidos grasos de cadena presentes en Pdp11 y Pdp13 debido a las características del cromatógrafo utilizado y a la ausencia de patrones específicos. Dichos ácidos grasos podrían estar relacionados con la capacidad de protección frente a patógenos que confieren los dos probióticos ensayados. Es por ello necesario estudiar en el futuro el contenido de ácidos grasos de cadena corta en Pdp11 y Pdp13. En este sentido, resulta interesante destacar que en la microbiota digestiva de ejemplares de lenguado senegalés salvajes o alimentados con poliquetos marinos, organismos cercanos a los estudiados por Pérez-Gutierrez (2005) se ha encontrado *Shewanella sp.* (Makridis *et al.*, 2004; Martín-Antonio *et al.*, 2007). La adición de las cepas Pdp11 y Pdp13 ensayadas en dieta estarían promoviendo las defensas naturales del lenguado senegalés.

10. Resumen general sobre la influencia de la alimentación con los probióticos Pdp11 y Pdp13 sobre el crecimiento y salud de lenguado senegalés en engorde

La adición de los probióticos ensayados protegió en todos los casos a los juveniles de lenguado senegalés frente a infección experimental con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, el patógeno más virulento para el cultivo de esta especie. Además un tiempo de administración en dieta de 15 días demostró ser suficiente para promover dicha protección. Esta mayor resistencia frente al patógeno empleado se produjo con ambas cepas ensayadas, (*S. putrefaciens* Pdp11 y *S. baltica* Pdp13). El porcentaje de supervivencia relativa (RPS) observado decreció en relación a la mayor calidad del pienso utilizado.

Asimismo, en todos los casos se observó una modulación de la microbiota intestinal de los juveniles de lenguado senegalés asociada a la adición de los dos probióticos ensayados, de mayor intensidad en los especímenes alimentados con Pdp13, que sin embargo presentaron una reducción de la riqueza específica. La forma de administración tuvo diferente efecto, siendo más acusado el ejercido por la cepa liofilizada que por la cepa fresca. La influencia de la adición probiótica sobre la microbiota intestinal estuvo ligada al periodo de administración en dieta, lo que sugiere la existencia de un efecto no dependiente de la colonización del intestino por parte de la cepa utilizada. Están en curso trabajos de secuenciación e identificación, que permitirán conocer la evolución en el tiempo de las especies bacterianas, en relación con la adición de la dieta probiótica y con la supresión de la misma. Estudios preliminares indican que la composición específica de la microbiota intestinal en los ejemplares que recibieron ambas dietas probióticas, se encuentra más próxima a la habitual de la especie en estado salvaje (datos no presentados).

Ha resultado de gran importancia la observación de una mejor condición del digestivo e hígado en aquellos ejemplares de lenguado senegalés alimentados con un pienso de alto contenido lipídico enriquecido con Pdp11, lo que sugiere la conveniencia de su utilización en dietas comerciales

Parece de gran interés señalar que la adición de ambos probióticos promovió tanto

en músculo como en hígado, menores valores de los ácidos estearidónico (18:4n-3) y tetraenoico (20:4n-3) relacionados con la síntesis de eicosanoides y el bienestar de los ejemplares. Asimismo, se detectó en ambas cepas la presencia de ácidos grasos de cadena corta y media con actividad antimicrobiana, implicados en la mejor absorción de nutrientes. Resaltar que estos ácidos grasos están presentes en la dieta natural del lenguado senegalés. En las dietas suplementadas con Pdp11 se detectó un balance adecuado de los ácidos grasos esenciales DHA, EPA y ARA en todas las experiencias y un mejor perfil de ácidos grasos en los ejemplares alimentados con Pdp11 con respecto a los alimentados con Pdp13. Por todo lo anteriormente expuesto, se considera de gran interés el empleo del probiótico Pdp11 incorporado en una dieta comercial para su uso en el cultivo del lenguado senegalés. Asimismo, la composición bioquímica de la cepa podría ser mejorada para producir mayores niveles de aquellos ácidos grasos que resultaran de interés, como se realiza en la actualidad con otros microorganismos.

Resulta frecuente observar una reproducibilidad baja en los resultados obtenidos en trabajos con probióticos. Esto se puede explicar por la biología de las especies estudiadas, los diferentes protocolos de cultivo y alimentación empleados, la composición específica del alimento vivo o inerte utilizado y las características, dosis y frecuencias de administración de las cepas probióticas ensayadas, etc. En esta tesis se han observado resultados diferentes entre ensayos y respecto a los descritos por otros autores en algunos parámetros como crecimiento, composición corporal e histología del lenguado senegalés, que podrían ser atribuidos a diferencias en la temperatura y calidad del pienso comercial empleado.

Cabe señalar que a pesar de que sólo se ha detectado un mayor crecimiento de los ejemplares cuando Pdp11 fresco se ha incorporado a un pienso de elevado contenido lipídico, el nivel de metabolitos en plasma, hígado y músculo ha presentado valores más adecuados con la administración de esta cepa, incluso con los piensos más apropiados para esta especie. Se estima relevante el mayor nivel de glucógeno detectado en hígado, con ambas formas de incorporación en dieta, relacionado con una mejor reserva energética de los ejemplares, lo que proporciona una mejor capacidad de respuesta frente a un posible estrés. Estos resultados han sido confirmados en estudios posteriores realizados en nuestro centro que han mostrado cómo ejemplares alimentados con Pdp11 y sometidos a altas densidades de cultivo presentaron mayor supervivencia frente a una infección natural producida por *Vibrio* (datos no presentados).

La no existencia de respuesta inmunitaria sérica indicaría la inocuidad de los probióticos ensayados, ampliamente demostrada en los múltiples ensayos realizados, ya que en ningún caso se ha observado mortalidad en los peces alimentados con el probiótico. Sin embargo, conviene estudiar otros parámetros de respuesta inmunitaria diferentes a los ensayados y muy especialmente todos aquellos relacionados con la respuesta local en el intestino de los peces.

La administración de las cepas Pdp11 y Pdp13 frescas con alginato en nuestro ensayo permitió aumentar la viabilidad de las mismas en pienso hasta 15 días, lo que facilitó además su conservación. A pesar de que las dos cepas ensayadas están próximas, se registraron diferencias significativas entre ambas con respecto a sus características metabólicas y bioquímicas, así como una mayor capacidad de inhibición frente a patógenos “in vitro” de Pdp11 frente a Pdp13

El efecto producido por la incorporación del probiótico liofilizado, de reducida viabilidad en el pienso, sugiere que dicho efecto no necesariamente se corresponde con un proceso de colonización del intestino o es atribuible a una interacción de éste como microorganismo vivo y activo. Más bien parece condicionado por la existencia de enzimas, nutrientes que complementan la dieta del pez, sustancias inmunoestimulantes que actual localmente o bien se deben a la presencia de sustancias antimicrobianas. Se estima necesario avanzar en la comprensión de la compleja relación probiótico/huésped, observando la posible influencia del primero en el apoyo a la capacidad de homeostasis del segundo. Asimismo, se considera interesante profundizar en los mecanismos subyacentes a los efectos beneficiosos observados en los peces y llegar a determinar el factor o factores específicos origen de la protección conferida.

Las recientes investigaciones sobre la relación funcional existente entre los peces y su microbiota intestinal demuestran la gran influencia que esta tiene sobre la regulación de la expresión de numerosos genes en el tracto digestivo. Dichos genes están involucrados en el control de la proliferación del epitelio, el metabolismo de nutrientes y la respuesta inmune innata. Dada la capacidad de los probióticos para modificar la microbiota intestinal de los peces, se considera de gran interés el estudio de la influencia de la adición probiótica sobre la modulación de genes relacionados con las defensas naturales y la mayor capacidad de homeostasis de los ejemplares en cultivo.

Finalmente, sería deseable progresar hacia una mayor estandarización de resultados entre las diferentes investigaciones en este campo, con el fin de favorecer su interpretación y acelerar la entrada de los probióticos en la industria acuícola, que demanda una mayor reproducibilidad para incluir esta estrategia de bienestar animal en sus instalaciones.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Del presente estudio se establecen las siguientes conclusiones:

1. La adición de Pdp11 fresco en un pienso comercial de alto contenido lipídico mejora el crecimiento en los juveniles de lenguado senegalés, efecto que deja de observarse al mejorar la calidad del pienso utilizado.
2. La incorporación de Pdp11 liofilizado en una dieta comercial de alto contenido lipídico promueve una mejor condición del digestivo e hígado en ejemplares de lenguado senegalés durante el engorde.
3. La adición de Pdp11 promueve una mejora en el bienestar de lenguado senegalés reflejada en los niveles de metabolitos en el plasma, hígado y músculo de los ejemplares. Destaca el mayor nivel de glucógeno detectado en el hígado de los ejemplares. Se observa un efecto de mayor intensidad cuando el Pdp11 es administrado en fresco.
4. La adición de los probióticos Pdp11 y Pdp13 en la dieta modula la microbiota intestinal en los ejemplares de lenguado senegalés en engorde. Dicha modulación es más intensa en los ejemplares alimentados con Pdp13, que sin embargo presentan una menor riqueza específica.
5. La forma de administración de la cepa Pdp11 ejerce diferente modulación sobre la microbiota intestinal de lenguado senegalés en engorde, siendo más acusada la ejercida por la cepa liofilizada. Dicha modulación disminuye en el tiempo tras la suspensión de la adición probiótica.
6. A pesar de su proximidad taxonómica, Pdp11 y Pdp13 promueven diferencias en el crecimiento, la composición corporal, la histología de digestivo e hígado, la modulación de la microbiota digestiva y la actividad antiproteasa en suero de los ejemplares de lenguado senegalés en engorde.
7. Pdp11 y Pdp13 presentan diferencias en sus actividades metabólicas, en el nivel de lípidos totales y perfil de ácidos grasos, así como en las actividades de inhibición “in vitro” de los patógenos *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*.
8. La adición de los probióticos Pdp11 y Pdp13 no afecta especialmente a las respuestas inmunitarias innata y específica estudiadas, exceptuando la actividad antiproteasa en el suero de ejemplares alimentados con Pdp13.
9. La incorporación de los probióticos Pdp11 y Pdp13 en la dieta protege a los juveniles de lenguado senegalés frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*.
10. La utilización de alginato cálcico como método de incorporación de los probióticos al pienso no afecta significativamente los parámetros de crecimiento y salud estudiados, protege la viabilidad de los probióticos frescos y facilita su inclusión en el pienso.

11. La comparación de los resultados obtenidos permite seleccionar la cepa Pdp11 frente a Pdp13 para su uso en el cultivo de lenguado senegalés. La forma de incorporación de Pdp11 en fresco proporciona los mejores resultados, respecto a la forma liofilizada.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Sharifuzzaman, S. M. and Austin, B. (2010). Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* **33**, 31-37.
- Abellán, E. and Basurco, B. (1999). Marine Finfish Species Diversification: Current Situation and Prospects in Mediterranean Aquaculture. *Cahiers Options Méditerranéennes. Serie B: Etudes et Recherches* **24**, 1016-1228.
- Acosta, F., Real, F., Ellis, A. E., Tabraue, C., Padilla, D. and Ruiz De Galarreta, C. M. (2005). Influence of vaccination on the nitric oxide response of gilthead seabream following infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish and Shellfish Immunology* **18**, 31-38.
- Aguilera, E. and Amat, J. A. (2007). Carotenoids, immune response and the expression of sexual ornaments in male greenfinches (*Carduelis chloris*). *Naturwissenschaften* **94**, 895-902.
- Akinbowale, O. L., Peng, H. and Barton, M. D. (2006). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology* **100**, 1103-1113.
- Almansa, C., Reig, L., Duarte, S. and Oca, J. (2010). Use of laser scanning to estimate flatfish biomass in a tank. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 101-102.
- Alonso, M. C., Cano, I., García-Rosado, E., Castro, D., Lamas, J., Barja, J. L. and Borrego, J. J. (2005). Isolation of lymphocystis disease virus from sole, *Solea senegalensis* Kaup, and blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brünnich). *Journal of Fish Diseases* **28**, 221-228.
- Aly, S. M., Abd-El-Rahman, A. M., John, G. and Mohamed, M. F. (2008a). Characterization of Some Bacteria Isolated from *Oreochromis niloticus* and their Potential Use as Probiotics. *Aquaculture* **277**, 1-6.
- Aly, S. M., Fathi, M. and John, G. (2008b). Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research* **39**, 647-656.
- Amend, D. F. (1981). Potency testing of fish vaccines. *D.P. Anderson and W. Hennessen (ed.), Fish biologics: serodiagnostics and vaccines*, S. Karger, Basel, Switzerland, 447-454.
- Andlid, T., Vázquez-Juárez, R. and Gustafsson, L. (1995). Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microbial Ecology* **30**, 321-334.
- Ando, S., Nakajima, K. and Hatano, M. (1992). Incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into phospholipids of a marine bacterium *Vibrio* sp. cultivated with sardine oil. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **73**, 169-171.
- Ando, Y., Samoto, H. and Murayama, Y. (2004). Positional distribution of DHA and EPA in triacyl-sn-glycerols (TAG) of *Artemia franciscana* nauplii enriched with fish oils ethyl esters and TAG. *Aquaculture* **233**, 321-335.
- Anguis, V. and Cañavate, J. P. (2005). Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* **243**, 133-145.

- Anguis, V., Chereguini, O., Rodríguez, C. and Moure, M. (2007a). Seasonal changes in sperm quality and production of senegal sole *Solea senegalensis* during an annual cycle in two facilities from Northern (Santander) and Southern (Cádiz) of Spain. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 22-28 Istanbul (Turkey).
- Anguis, V., Moure, M. and Cañavate, J. P. (2007b). Estudio comparativo de aspectos reproductivos en lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) en función de su origen salvaje ó cultivado. In *XI Spanish Aquaculture Society Meeting*, September 24-28 2007, Vigo (España).
- APROMAR (2010). La acuicultura marina de peces en España. Informe 2010 de la Asociación de Productores Marinos. p. 66.
- Aragao, C., Conceicao, L. E. C., Dias, J., Marques, A. C., Gomes, E. and Dinis, M. T. (2003a). Soy protein concentrate as a protein source for Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) diets: effects on growth and amino acid metabolism of postlarvae. *Aquaculture Research* **34**, 1443-1452.
- Aragao, C., Conceicao, L. E. C., Lacuisse, M., Yúfera, M. and Dinis, M. T. (2007). Do dietary amino acid profiles affect performance of larval gilthead seabream? *Aquatic Living Resources* **20**, 155-161.
- Aragao, C., Conceicao, L. E. C., Martins, D., Ronnestad, I., Gomes, E. and Dinis, M. T. (2003b). A balanced dietary amino acid profile improves amino acid retention in post-larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* **233**, 293-304.
- Aragao, C., Corte-Real, J., Costas, B., Dinis, M. T. and Conceicao, L. E. C. (2008). Stress response and changes in amino acid requirements in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Amino Acids* **34**, 143-148.
- Araújo, L., Cunha, M. and Afonso, A. (2010). The host/pathogen interaction during experimental infection of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) by *Tenacibaculum maritimum*. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 81-82.
- Arijo, S., Brunt, J., Chabrillón, M., Díaz-Rosales, P. and Austin, B. (2008). Subcellular components of *Vibrio harveyi* and probiotics induce immune responses in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *V. harveyi*. *Journal of Fish Diseases* **31**, 579-590.
- Arijo, S., Chabrillón, M., Díaz-Rosales, P., Rico, R., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M. C., Toranzo, A. E. and Moriñigo, M. A. (2005a). Bacteria isolated from outbreaks affecting culture sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Bulletin European Association of Fish Pathology* **25(4)**, 148-154.
- Arijo, S., Rico, R., Chabrillón, M., Diaz-Rosales, P., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M. C., Magariños, B., Toranzo, A. E. and Moriñigo, M. A. (2005b). Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases* **28**, 33-38.
- Arjona, F. J., L.Vargas-Chacoff, Ruíz-Jarabo, I., Río, M. P. M. d. and Mancera, J. M. (2007). Osmoregulatory response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to changes in environmental salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **148**, 413-421.
- Arjona, F. J., Vargas-Chacoff, L., Ruíz-Jarabo, I., Goncalves, O., Pascoa, I., Río, M. P. M. d. and Mancera, J. M. (2009). Tertiary stress responses in Senegalese sole (*Solea*

- senegalensis Kaup, 1858) to osmotic challenge: Implications for osmoregulation, energy metabolism and growth. *Aquaculture* **287**, 419-426.
- Asensio, E., Salas-Leiton, E., Infante, C., Zerolo, R. and Cañavate, J. P. (2010). Effect of salinity on hatching rate and early larval development of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 143-144.
- Askness, A., Hjertnes, T. and Opstvedt, J. (1996). Effect of dietary protein level on growth and carcass composition in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.). *Aquaculture* **145**, 225-233.
- Aubin, J., Gatesoupe, F.-J., Labbe, L. and Lebrun, L. (2005). Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research* **36**, 758-767.
- Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P. A. W., Effendi, I. and Griffith, D. R. W. (1995). A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases* **18**, 93-96.
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A. E., Romalde, J. L., Lemos, M. L. and Magariños, B. (2005). A novel O-serotype in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **25**, 70-74.
- Badillo-Zapata, D., Correa-Reyes, G., D'Abramo, L. R., Lazo, J. P., Toro-Vázquez, J. F. and Viana, M. T. (2010). Effect of replacing dietary fish oil with vegetable oils on the fatty acid composition of muscle tissue of juvenile California halibut (*Paralichthys californicus*). *Ciencias Marinas* **36**, 121-132.
- Bagheri, T., Hedayati, S. A., Yavari, V., Alizade, M. and Farzanfar, A. (2008). Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **8**, 43-48.
- Bagni, M., Romano, N., Finoia, M. G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P. G., Sarti, M. and Marino, G. (2005). Short- and long-term effects of a dietary yeast [beta]-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology* **18**, 311-325.
- Balcázar, J. L., Blas, I. D., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Múzquiz, J. L. (2006a). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* **114**, 173-786.
- Balcázar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zazuela, I., Calvo, A. C., Márquez, I., Gironés, O. and Muzquiz, J. L. (2007). Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal Nutrition* **97**, 522-552.
- Balcázar, J. L. and Rojas-Luna, T. (2007). Inhibitory Activity of Probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 Against *Vibrio* Species Confers Protection Against Vibriosis in Juvenile Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current Microbiology* **55**, 409-412.
- Balcázar, J. L., Vendrell, D., Blas, I. D., Ruíz-Zarzuela, I., Gironés, O. and Múzquiz, J. L. (2006b). Immune modulation by probiotic strains: Quantification of phagocytosis of *Aeromonas salmonicida* by leukocytes isolated from gut of rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) using a radiolabelling assay. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **29**, 335-343.
- Balcázar, J. L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I. and Múzquiz, J. L. (2009). *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* infection in brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **17**, 153-157.
- Balfry, S. K. and Higgs, D. A. (2001). Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. In *Nutrition and Fish Health* (Lim, C. and C.D.Webster, eds.), pp. 213-234. New York: Haworth Press Inc.
- Barnes, A. C., Balebona, M. C., Horne, M. T. and Ellis, A. E. (1999). Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. *Microbiology* **145**, 483-494.
- Bell, J. G. (1998). Current aspects of lipid nutrition in fish farming In *Biology of Farmed Fish* (Pickering, K. D. B. A. D., ed.), pp. 114-139. Sheffield England: Academic Press.
- Bell, J. G., Cowey, C. B., Adron, J. W. and Shanks, A. M. (1985). Some effects of Vitamin E and Selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *British Journal of Nutrition* **53**, 149-157.
- Bell, J. G., McVicar, A. H., Park, M. T. and Sargent, J. R. (1991). High dietary linoleic acid affects the fatty acid compositions of individual phospholipids from tissues of Atlantic Salmon (*Salmo salar*): Association with stress susceptibility and cardiac lesion. *Journal of Nutrition* **121**, 1163-1172.
- Bell, J. G., Strachan, F., Good, J. E. and Tocher, D. R. (2006). Effect of dietary *Echium* oil on growth, fatty acid composition and metabolism, gill prostaglandin production and macrophage activity in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research* **37**, 606-617.
- Bell, J. G. and Waagbo, R. (2008). Safe and Nutritious Aquaculture Produce: Benefits and Risks of Alternative Sustainable Aquafeeds. In *Aquaculture in the Ecosystem*, pp. 185-225: Springer Netherlands.
- Bell, M. V., Batty, R. S., Dick, J. R., Fretwell, K., Navarro, J. C. and Sargent, J. R. (1995). Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids* **30**, 443-449.
- Bengten, E., Wilson, M., Miller, N., Clem, L. W., Pilstrom, L. and Warr, G. W. (2000). Immunoglobulin isotypes: structure, function and genetics. *Current topics in Microbiology and Immunology* **248**, 189-219.
- Bergmeyer, H. U., Grassl, M. and Walter, H.-E. (1983). Enzymes. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. and Grassl, M., eds.), pp. 126-328. Weinheim: Verlag Chemie.
- Biomar (2009). Pienso con probióticos para acuicultura. *Biomar Magazine*.
- Blanco-Vives, B., Vera, L. M., Mañanos, E., Ramos, J., Bayarri, M. J. and Sánchez-Vázquez, F. J. (2010). Larvae exposure to daily thermo-cycles affects sex differentiation in juvenile sole (*Solea senegalensis*). In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 1178-1179.

- Blanchard, G., Gardeur, J. N., Mathis, N., Brun-Bellut, J. and Kestemont, P. (2008). Ultrastructural features of hepatocytes in cultured Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) as affected by nutritional and husbandry conditions. *British Journal of Nutrition* **100**, 317-331.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **37**, 911-917.
- Blinkova, L. P., Gorobets, O. B. and Baturo, A. P. (2001). Biological activity of *Spirulina platensis*. *Zurnal mikrobiologii, épidemiologii i immunobiologii* **2**, 114-118.
- Blum, S. and Schiffrin, E. J. (2001). Intestinal Microflora and Homeostasis of the Mucosal Immune Response: Implications for Probiotic Bacteria? In *Probiotics and Prebiotics: Where are we going?* (Tannock, G. W., ed.), pp. 311-330. Wymondham (United Kingdom): Caister Academic Press.
- Bly, J. E., Quiniou, S. M. and Clem, L. W. (1997). Environmental effects on fish immune mechanisms. *Developments in Biological Standardization* **90**, 33-43.
- Bogut, I., Milakovic, Z., Brkic, S., Novoselic, D. and Bukvic, Z. (2000). Effects of *Enterococcus faecium* on the growth rate and content of intestinal microflora in sheat fish (*Silurus glanis*). *Veterinary Medicine Czech* **45**, 107-109.
- Bogut, I., Milakovic, Z., Brkic, S. and Zimmer, R. (1998). Influence of probiotic (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content of intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*). *Czech Journal of Animal Science* **43**, 231-235.
- Boluda-Navarro, D., Luz, R. K., Sánchez-Vázquez, F. J. and Madrid, J. A. (2004). Macronutrients self-selection in sole (*Solea senegalensis*). In *European Aquaculture Society Meeting*, October 20-23 2004, Barcelona (Spain).
- Boluda-Navarro, D., Sánchez-Vázquez, F. J., Zamora, S. and Madrid, J. A. (2005). Estudio de la actividad anticipatoria a la alimentación en lenguado: *Solea senegalensis*. In *X Spanish Aquaculture Society Meeting*, October 17-21 2005, Gandía (Spain). pp. 172-173.
- Boon, P. I. and Cattnach, M. (1999). Antibiotic resistance of native and faecal bacteria isolated from rivers, reservoirs and sewage treatment facilities in Victoria, south-eastern Australia. *Letters in Applied Microbiology* **28**, 164-168.
- Bordas, M. A., Balebona, M. C., Chabrillón, M., Rodríguez-Maroto, J. M. and Moriñigo, M. A. (2003). Influence of temperature and salinity on the adhesion to mucose surfaces of gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.) of pathogenic strains of *Vibrio alginolyticus* and *Listonella anguillarum*. *Bulletin European Association of Fish Pathology* **26**, 273-280.
- Borges, P., Medale, F., Dias, J. and Valente, L. M. P. (2010). Influence of different protein/lipid ratios on growth performance and intermediary metabolism of Senegalese sole. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 224-225.
- Borges, P., Oliveira, B., Casal, S., Dias, J., Conceicao, L. E. C. and Valente, L. M. P. (2009). Dietary lipid level affects growth performance and nutrient utilisation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *British Journal of Nutrition* **102**, 1007-1010.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Broadbent, J. R., Larsen, R. L., Deibel, V. and Steele, J. L. (2010). Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. *Journal of Bacteriology* **192**, 2445-2458.
- Bromley, P. J. (1980). The effect of dietary water content and feeding rate on the growth and food conversion efficiency of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* **20**, 91-99.
- Broughton, K. S., Whelan, J., Hardardottir, I. and Kinsella, J. E. (1991). Effect of increasing the dietary (n-3) to (n-6) Polyunsaturated Fatty Acid Ratio on Murine Liver and Peritoneal Cell Fatty Acids and Eicosanoid Formation. *Journal of Nutrition* **121**, 155-164.
- Brunt, J. and Austin, B. (2005). Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* **28**, 693-701.
- Brunt, J., Hansen, R., Jamieson, D. J. and Austin, B. (2008). Proteomic analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) serum after administration of probiotics in diets. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **121**, 199-205.
- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A. and Austin, B. (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* **30**, 573-579.
- Brunvold, L., Sandaa, R.-A., Mikkelsen, H., Welde, E., Bleie, H. and Bergh, O. (2007). Characterisation of bacterial communities associated with early stages of intensively reared cod (*Gadus morhua*) using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Aquaculture* **272**, 319-327.
- Bucolo, G. and David, H. (1973). Quantitative Determination of Serum Triglycerides by the Use of Enzymes. *Clin Chem* **19**, 476-482.
- Buentello, J. A. and Gatlin, D. M. (2001). Effects of Elevated Dietary Arginine on Resistance of Channel Catfish to Exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health* **13**, 194-201.
- Burrells, C., Williams, P. D. and Forno, P. F. (2001). Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds: 1. Effects on resistance to disease in salmonids. *Aquaculture* **199**, 159-169.
- Buts, J. P., Keyser, N. D., Marandi, S., Hermans, D., Sokai, E. M., Chae, Y.-H. E., Lambotte, L., Chanteux, H. and Tulkens, P. M. (1999). *Saccharomyces boulardii* upgrades cellular adaptation after proximal enterotomy in rats. *Gut* **45**, 89-96.
- Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., Kjørsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernández, A. J. and Rosenlund, G. (2003). Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture* **225**, 325-340.
- Caballero, M. J., López-Calero, G., Socorro, J., Roo, F. J., Izquierdo, M. S. and Fernández, A. J. (1999). Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **179**, 277-290.

- Caballero, M. J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M. and Izquierdo, M. S. (2002). Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **214**, 253-271.
- Cabral, H. N. (2000). Comparative feeding ecology of sympatric *Solea solea* and *S. senegalensis*, within the nursery areas of the Tagus estuary, Portugal. *Journal of Fish Biology* **57**, 1550-1562.
- Cabrita, E., Soares, F., Beirao, J., Aragao, C., Diogo, P., Madeira, C., Mira, S. and Dinis, M. T. (2008). Male Reproductive Performance in *Solea senegalensis*. In *IV International Sole Workshop*, November 14-17, Faro (Portugal).
- Cal, R., Castro, J., Chereguini, O., Mañanós, E., Pino, A., Olmedo, M., Peleteiro, J. B., Gómez, C., Álvarez-Blázquez, B., Rodríguez, C., Guzmán, J. M. and Martínez, P. (2007). Estructura reproductiva determinada con marcadores microsatélites en stocks de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). In *I Ibero-American Marine Resource and Aquaculture Forum*, O Grove (Spain).
- Calder, P. C. and Kew, S. (2002). The immune system: a target for functional foods? *British Journal of Nutrition* **88**, S165-S176.
- Cano, I., Valverde, E. J., López-Jimena, B., Alonso, M. C., García-Rosado, E., Sarasquete, C., Borrego, J. J. and Castro, D. (2010). A new genotype of *Lymphocystivirus* isolated from cultured gilthead seabream, *Sparus aurata* L., and Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases* **33**, 695-700.
- Cañavate, J. P. (2005). Opciones del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 para diversificar la acuicultura marina *Boletín Instituto Español de Oceanografía* **21**, 147-154.
- Cañavate, J. P. and Fernández-Díaz, C. (1999). Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* **174**, 255-263.
- Cañavate, J. P., Zerolo, R. and Fernández-Díaz, C. (2006). Feeding and development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in different photoperiods. *Aquaculture* **258**, 368-377.
- Capkin, E. and Altinok, I. (2009). Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *Journal of Applied Microbiology* **106**, 1147-1153.
- Cara, J. B., Moyano, F. J., Yúfera, M. and Cañavate, J. P. (2003). Actividades de tripsina y quimiotripsina como indicadores de condición durante la etapa larvaria del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) In *IX Spanish Aquaculture Society Meeting*, May 12-16 2003, Cádiz (Spain). pp. 370-371.
- Carazo, I., Chereguini, O., Huntingford, F., Martín, I., Norambuena, F. and Duncan, N. (2009). Observaciones del cortejo de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) salvaje mantenido en cautividad. In *XII Spanish Aquaculture Society Meeting*, November 24-26 2009, Madrid (Spain).
- Carnevali, O., de Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S. and Cresci, A. (2006). Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* **258**, 430-438.

- Carter, C. G. and Houlihan, D. F. (2001). Protein synthesis. *Fish Physiology* **Volume 20**, 31-75.
- Castro, R., Couso, N., Obach, A. and Lamas, J. (1999). Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish & Shellfish Immunology* **9**, 529-541.
- Cepeda, C. and Santos, Y. (2002). First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. *Bulletin European Association of Fish Pathology* **22**, 388-392.
- Cerdá, J., Chauvigne, F., Agulleiro, M. J., Marin, E., Halm, S., Martínez-Rodríguez, G. and Prat, F. (2008). Molecular cloning of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits and expression pattern during spermatogenesis. *General and Comparative Endocrinology* **156**, 470-481.
- Conceição, L. E. C., Ribeiro, L., Engrola, S., Aragao, C., Morais, S., Lacuisse, M., Soares, F. and Dinis, M. T. (2007). Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* **268**, 64-81.
- Costas, B., Aragão, C., Mancera, J. M., Dinis, M. T. and Conceicao, L. E. C. (2008). High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquaculture Research* **39**, 1-9.
- Costas, B., Silva, J. M. G., Conceicao, L. E. C., Dias, J., Valente, L. M. P. and Afonso, A. (2010). Influence of fish meal replacement by plant-protein sources and indispensable amino acids supplementation on innate immune parameters of Senegalese sole *Solea senegalensis* In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9, Porto (Portugal).
- Couso, N., Castro, R., Magariños, B., Obach, A. and Lamas, J. (2003). Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture* **219**, 99-109.
- Cowey, C. B. (1975). Aspects of protein utilization by fish. *Proceedings of the Nutrition Society* **34**, 57-63.
- Cuesta, A., Esteban, M. A. and Meseguer, J. (2002). Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C. *Fish & Shellfish Immunology* **13**, 97-109.
- Cuesta, A., Esteban, M. A., Ortuño, J. and Meseguer, J. (2001). Vitamin E increases natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* **11**, 293-302.
- Cuesta, A., Rodríguez, A., Muñoz, P., Esteban, M. A. and Meseguer, J. (2003). Uso de hongos como suplemento dietético inmunoestimulante de doradas. In *IX Spanish Aquaculture Society Meeting*, May 12-16 2003, Cádiz (Spain).
- Chabanaud, P. (1927). Les soles de l'Atlantique oriental nord et des mers adjacentes. *Bulletin Institute Oceanographique de Monaco* **488**, 1-66.
- Chabrillón, M. (2004). Estudio de la interacción de patógenos piscícolas y potenciales bacterias probióticas con las superficies mucosas de dorada (*Sparus aurata*, L.). *Tesis. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga*, 224 pp.

- Chabrillón, M., Balebona, M. C. and Moriñigo, M. A. (2003). Interactions of fish pathogenic *Vibrio* species with the mucous surfaces of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Recent Research Developments in Microbiology*.
- Chabrillón, M., Ouwehand, A. C., Díaz-Rosales, P., Arijo, S., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M. C. and Moriñigo, M. A. (2006). Adhesion of lactic acid bacteria to mucus of farmed gilthead seabream, and interactions with fish pathogenic microorganisms. *Bulletin European Association of Fish Pathology* **26**, 202-210.
- Chabrillon, M., Rico, R. M., Arijo, S., Diaz-Rosales, P., Balebona, M. C. and Moriñigo, M. A. (2005). Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases* **28**, 531-537.
- Chabrillón, M., Rico, R. M., Balebona, M. C. and Moriñigo, M. A. (2005). Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases* **28**, 229-237.
- Chang, C. I. and Liu, W. Y. (2002). An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases* **25**, 311-315.
- Chelossi, E., Vezzulli, L., Milano, A., Branzoni, M., Fabiano, M., Riccardi, G. and Banat, I. M. (2003). Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. *Aquaculture* **219**, 83-97.
- Cheng, A. C., Tu, C. W., Chen, Y. Y., Nan, F. H. and Chen, J. C. (2007). The immunostimulatory effects of sodium alginate and iota-carrageenan on orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology* **22**, 197-205.
- Chereguini, O. (2006). Natural spawns of wild senegal sole obtained by thermoperiod manipulation in Cantabria (Northern Spain). In *III Sole Workshop*, March 22-23, El Toruño (Spain).
- Chereguini, O., Anguis, V., Peleteiro, J. B. and Guzmán, J. M. (2006). Sperm quality in senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). In *European Aquaculture Society Meeting*, May 10-13, Florence (Italy).
- Chereguini, O., Banda, I. G. d. I., Díez, J., Lobo, C. and Linares, F. (2005a). Effect of different feeding regimes on senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larval culture in Cantabria (Northern Spain). In *World Aquaculture Society Meeting*, May 5-10, Bali (Indonesia).
- Chereguini, O. and Díez, J. (2003). Experiencias de destete de *Solea senegalensis* en el cantábrico. In *IX Spanish Aquaculture Society Meeting*, May 12-16 2003, Cádiz (Spain).
- Chereguini, O., García de la Banda, I., Lobo, C. and Linares, F. (2005b). Coalimentación larvaria y destete de *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) con dos dietas comerciales. In *X Spanish Aquaculture Society Meeting*, October 17-21 2005, Gandía (Spain). pp. 368-369.
- Damaso-Rodrigues, M. L., Pousao-Ferreira, P., Ribeiro, L., Coutinho, J., Bandarra, N. M., Gavaia, P. J., Narciso, L. and Morais, S. (2010). Lack of essential fatty acids in live feed during larval and post-larval rearing: effect on the performance of juvenile *Solea senegalensis*. *Aquaculture International* **18**, 741-757.

- Daniels, C. L., Merrifield, D. L., Boothroyd, D. P., Davies, S. J., Factor, J. R. and Arnold, K. E. (2010) Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. *Aquaculture* **304**, 49-57.
- Daniels, W. H. and Robinson, E. H. (1986). Protein and energy requirements of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* **53**, 243-252.
- Day, O. J., Howell, B. R., Akness, A. and Nygard, E. (1999). Recent advances in the weaning of sole, *Solea solea* (L.). *European Aquaculture Society Special Publication* **27**, 40-41.
- de Blas Carbonero, A. (2005). La acuicultura: garantía de calidad. In *X Spanish Aquaculture Society Meeting*, Gandía (Spain).
- de la Gándara, F., Raja, T. and García-Gómez, A. (2003). El aceite de clavo como anestésico de *Seriola dumerili*: uso y recomendaciones. In *IX Spanish Aquaculture Society Meeting*, May 12-16 2003, Cádiz (Spain).
- de Moura, R. S., Saliba, E. D. O. S., de Almeida, F. Q., Lana, A. M. Q., Silva, V. P. and de Rezende, A. S. C. (2009). Feed efficiency in Mangalarga Marchador foals fed diet supplemented with probiotics or phytase. *Eficiência alimentar de potros da raça Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada com probióticos ou fitase* **38**, 1045-1050.
- De Schrijver, R. and Ollevier, F. (2000). Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture* **186**, 107-116.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W. and Bossier, P. (2007). Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology* **25**, 472-479.
- Dias, D. C., Stéfani, M. V., Ferreira, C. M. and França, F. M. (2008). Use of probiotics in the ration of bullfrog (*Rana catesbeiana*) productive performance. *Archivos de Zootecnia* **57**, 449-455.
- Dias, J., Rueda-Jasso, R., Panserat, S., Conceicao, L. E. C., Gomes, E. F. and Dinis, M. T. (2004). Effect of dietary carbohydrate-to lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Aquaculture Research* **35**, 1122-1130.
- Dias, J., Yúfera, M., Valente, L. M. P. and Rema, P. (2010). Feed transit and apparent protein, phosphorus and energy digestibility of practical feed ingredients by Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* **302**, 94-99.
- Díaz-López, M., Pérez, M. J., Acosta, N. G., Jerez, S., Dorta-Guerra, R., Tocher, D. R., Lorenzo, A. and Rodríguez, C. (2010). Effects of dietary fish oil substitution by Echium oil on enterocyte and hepatocyte lipid metabolism of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **155**, 371-379.
- Díaz-López, M., Pérez, M. J., Acosta, N. G., Tocher, D. R., Jerez, S., Lorenzo, A. and Rodríguez, C. (2009). Effect of dietary substitution of fish oil by Echium oil on growth, plasma parameters and body composition on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Nutrition* **15**, 500-512.

- 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. In *Departamento de Microbiología*, p. 150. Málaga: Universidad de Málaga.
- Díaz-Rosales, P., Arijó, S., Chabrillón, M., Alarcón, F. J., Tapia-Paniagua, S. T., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M. C. and Moriñigo, M. A. (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.
- Díaz-Rosales, P., Burmeister, A., Aguilera, J., Korbee, N., Moriñigo, M. A., Figueroa, F. L., Chabrillón, M., Arijó, S., Lindequist, U. and Balebona, M. C. (2005). Screening of algal extracts as potential stimulants of chemotaxis and respiratory burst activity of phagocytes from sole (*Solea senegalensis*). *Bulletin of European Association of Fish Pathology* **25**, 321-331.
- Díaz-Rosales, P., Chabrillón, M., Arijó, S., Martínez-Manzanares, E., Moriñigo, M. A. and Balebona, M. C. (2006). Superoxide dismutase and catalase activities in *Photobacterium damsela* ssp. piscicida. *Journal of Fish Diseases* **29**, 355-364.
- Díaz-Rosales, P., Chabrillón, M., Moriñigo, M. A. and Balebona, M. C. (2003). Survival against exogenous hydrogen peroxide of *Photobacterium damsela* subsp. piscicida under different culture conditions. *Journal of Fish Diseases* **26**, 305-308.
- Dinis, M. T. (1992). Aspects of the potential of *Solea senegalensis* Kaup for aquaculture: larval rearing and weaning to an artificial diet. *Aquaculture Research* **23**, 515-520.
- Dinis, M. T., Ribeiro, L., Soares, F. and Sarasquete, C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* **176**, 27-38.
- Do Vale, A., Afonso, A. and Silva, M. T. (2002). The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish & Shellfish Immunology* **13**, 183-198.
- Drake, P. and Arias, A. M. (1989). Hábitos alimentarios de estados juveniles de peces en los caños de las salinas de Cádiz. In *Acuicultura Intermareal*, pp. 249-257: M. Yúfera (eds). Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía. Cádiz.
- Duncan, N., Carazo, I., Chereguini, O., Norambuena, F., Mañanós, E. and Estévez, A. (2008). Reproductive behaviour of Senegal sole (*Solea senegalensis*). In *IV International Sole Workshop* November 14-17, Faro (Portugal).
- Eddy, S. D. and Jones, S. H. (2002). Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. *Aquaculture* **211**, 9-28.
- El-Haroun, E. R., Goda, A. M. A. S. and Kabir Chowdhury, M. A. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research* **37**, 1473-1480.
- Ellis, A. E. (1999). Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology* **9**, 291-308.

- Engrola, S., Conceicao, L. E. C., Gavaia, P. J., Cancela, M. L. and Dinis, M. T. (2005). Effects of pre-weaning feeding frequency on growth, survival and deformation of senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* **57**, 10-18.
- Engrola, S., Figueira, L., Conceicao, L. E. C., Gavaia, P. J., Ribeiro, L. and Dinis, M. T. (2009). Co-feeding in Senegalese sole larvae with inert diet from mouth opening promotes growth at weaning. *Aquaculture* **288**, 264-272.
- Erdal, J. I., Evensen, O., Kaurstad, O. K., Lillehaug, A., Solbakken, R. and Thorud, K. (1991). Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. *Aquaculture* **98**, 363-379.
- Estévez, A. (2004). Feeding with arachidonic acid enriched live prey induce albinism in flatfish larvae. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 20-23 2004, Barcelona (Spain). pp. 326-327.
- Estévez, A., McEvoy, L. A., Bell, J. G. and Sargent, J. R. (1999). Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in Arachidonic and Eicosapentaenoic acids. *Aquaculture* **180**, 321-343.
- FAO (2001). *Report of the Conference on Aquaculture in the Third Millenium. Bangkok, Tailandia, 20-25 February 2000*. Rome: FAO Fisheries Department.
- FAO (2002). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome: FAO Fisheries Department.
- FAO (2003). *Review of the World State of Aquaculture. Circular. No 886, Rev.2*. Rome: FAO Inland Water Resources and Aquaculture Service.
- FAO (2004). *The State of the World Fish and Aquaculture* Roma: Fisheries and Aquaculture Department.
- FAO (2007a). FAO Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service. Capture production 1950-2005. FISHSTAT Plus - Universal software for fishery statistical time series. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO (2007b). *The state of world fisheries and aquaculture 2006*. Rome (Italy): FAO Fisheries Department.
- FAO (2008). FAO Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service. Capture production 1950-2006. FISHSTAT Plus - Universal software for fishery statistical time series. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO (2009). FAO Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service. Capture production 1950-2007. FISHSTAT Plus - Universal software for fishery statistical time series. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO (2010). FAO Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service. Capture production 1950-2008. FISHSTAT Plus - Universal software for fishery statistical time series. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Ferguson, R. M. W., Merrifield, D. L., Harper, G. M., Rawling, M. D., Mustafa, S., Picchietti, S., Balcázar, J. L. and Davies, S. J. (2010) The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology* **109**, 851-862.

- Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., Cañavate, J. P., Moyano, F. J., Alarcón, F. J. and Díaz, M. (2001). Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *Journal of Fish Biology* **58**, 1086-1097.
- Fernández-Reiriz, M. J., Perez-Camacho, A., Ferreiro, M. J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M. J. and Labarta, U. (1989). Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* **83**, 17-37.
- Fernández, I., Pimentel, M. S., Ortiz-Delgado, J. B., Hontoria, F., Sarasquete, C., Estévez, A., Zambonino-Infante, J. L. and Gisbert, E. (2009). Effect of dietary vitamin A on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) skeletogenesis and larval quality. *Aquaculture* **295**, 250-265.
- Fjellheim, A. J., Playfoot, K. J., Skjermo, J. and Vadtsen, O. (2007). Vibrionaceae dominates the microflora antagonistic towards *Listonella anguillarum* in the intestine of cultured Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture* **269**, 98-106.
- Flajnik, M. F. (2010). All GOD's creatures got dedicated mucosal immunity. *Nature Immunology* **11**, 777-779.
- Francis, D. S., Turchini, G. M., Jones, P. L. and Silva, S. S. D. (2007). Effects of fish oil substitution with a mix blend vegetable oil on nutrient digestibility in Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. *Aquaculture* **269**, 447-455.
- Fuentes-Edfuf, C., García-González, P., García-Lamas, N., Rey, C., Riaza, A. and Santos, Y. (2009). Estudio de la actividad antagonista frente a patógenos de peces de bacterias aisladas de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup). In *XII Spanish Aquaculture Society Meeting*, November 24-26 2009, Madrid (Spain).
- Fulton, R. M., Nersessian, B. N. and Reed, W. M. (2002). Prevention of *Salmonella enteritidis* infection in commercial ducklings by oral chicken egg-derived antibody alone or in combination with probiotics. *Poultry Science* **81**, 34-40.
- Fuller, R. (1987). Probiotics 2: applications and practical aspects. In *Probiotics: the scientific basis* (Fuller, R., ed.), pp. 111-114. London (United Kingdom): Chapman & Hall.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* **66**, 365-378.
- Ganassin, R. C., Barlow, K. and Bols, N. C. (1998). Influence of glutamine on phytohemagglutinin stimulated mitogenesis of leucocytes from the rainbow trout head kidney. *Fish & Shellfish Immunology* **8**, 561-564.
- García-Díez, C. (2002). El bocinegro como especie alternativa para su producción en acuicultura : estudio comparativo de la excreción de amonio tras la alimentación con diferentes piensos experimentales. Las Palmas de GC: Universidad de Las Palmas de GC.
- García-González, P., Fuentes-Edfuf, C., García-Lamas, N., Piñeiro-Vidal, M., González, O., Riaza, A. and Santos, Y. (2009). Caracterización fenotípica de bacterias asociadas a un sistema cerrado de recirculación para el cultivo de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup). In *XII Spanish Aquaculture Society Meeting*, November 24-26 2009, Madrid (Spain).
- García-Millán, I., León-Rubio, J. M., Rosas-Ledesma, P., Tapia-Paniagua, S. T. and Arijo, S. (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).
- García de la Banda, I., Chereguini, O., Lobo, C., Díez, J., Linares, F. and Arce, F. (2005). Ongrowing of senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) fries using two different commercial diets in Cantabria (Northern Spain). In *World Aquaculture Society Meeting*, May 5-10 Bali (Indonesia).
- García de la Banda, I., Chereguini, O. and Rasines, I. (1992). Influencia de la adición de bacterias lácticas en el cultivo larvario de rodaballo (*Scophthalmus maximus*, L.). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* **8**, 247-254.
- García de la Banda, I., Lobo, C., Chereguini, O., Moriñigo, M. A., Chabrilón, M., León-Rubio, J. M., Arijo, S., Linares, F., Pazos, G. and Moreno-Ventas, X. (2006). Effect of probiotic Pdp11 on ongrowing of senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). In *European Aquaculture Society Meeting*, May 10-13, Florence (Italy).
- García de la Banda, I., Lobo, C., León-Rubio, J. M., Tapia-Paniagua, S., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., Moreno-Ventas, X., Lucas, L. M., Linares, F., Arce, F. and Arijo, S. (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., Lobo, C., León-Rubio, J. M., Tapia-Paniagua, S., Moriñigo, M. A., García-Millán, I., Arijo, S., Arce, F., Nicolás, M., Pazos, G. and Moreno-Ventas, X. (2009a). Administración de dos probióticos relacionados (Pdp11 y Pdp13) en preengorde de lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). In *XII Spanish Aquaculture Society Meeting*, November 24-26 2009, Madrid (Spain).
- García de la Banda, I., Lobo, C., Lucas, M. L., Tapia-Paniagua, S., Ruíz-Jarabo, I., León-Rubio, J. M., Mancera, J. M., Moriñigo, M. A., Arijo, S. and Moreno-Ventas, X. (2010). Influence of different ways of administration (fresh and lyophilized) of Pdp11 *Shewanella putrefaciens* on growth and performance of sole juveniles (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858). In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 494-495.
- García de la Banda, I., Lobo, C., Martín, I., Moriñigo, M. A., Arijo, S., León-Rubio, J. M., Tapia-Paniagua, S., Chabrilón, M., Pazos, G., Linares, F., Moreno-Ventas, X. and Canteras, J. C. (2008). Pdp11 probiotic use on *Solea senegalensis* (Kaup) larval and postlarval culture. In *IV International Sole Workshop*, November 14-17 Faro (Portugal).
- García de la Banda, I., Lobo, C., Martín, I., Moriñigo, M. A., Tapia-Paniagua, S., Chabrilón, M., León-Rubio, J. M., Arijo, S. and Moreno-Ventas, X. (2009b). Enhancement of larval and postlarval senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup) culture by Pdp11 *Shewanella* probiotic addition. In *European Aquaculture Society Meeting* August 14-17, Trondheim (Norway).
- García de la Banda, I., Lobo, C., Moriñigo, M. A., Chabrilón, M., León-Rubio, J. M., Arijo, S., Balebona, M. C., Linares, F., Pazos, G. and Moreno-Ventas, X. (2007a). Influence of lyophilized Pdp11 and Pdp13 probiotics on ongrowing of senegal sole *Solea senegalensis* (1858). In *European Aquaculture Society Meeting*, October 22-28, Istanbul (Turkey).

- García de la Banda, I., Lobo, C., Recalde, L., León-Rubio, J. M., Morifiño, M. A., Arijo, S., Chabrilón, M., Díaz-Rosales, P., Balebona, M. C., Martínez-Manzanares, E., Arce, F. and Nicolás, M. (2007b). Influencia de la adición del probiótico Pdp11 en el engorde del lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup 1858). In *XI Spanish Aquaculture Society Meeting*, September 24-28 2007, Vigo (Spain).
- García de la Banda, I., Lobo, C., Rodríguez, C., Linares, F., Pazos, G. and Moreno-Ventas, X. (2009c). Optimización del protocolo de cultivo larvario y destete del lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). In *XII Spanish Aquaculture Society Meeting*, November 24-26 2009, Madrid (Spain).
- García de la Banda, I., Martín, I., Lobo, C. and Moreno-Ventas, X. (2007c). Influencia del porcentaje lipídico en dietas isoprotéicas en el engorde del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858). In *XI Spanish Aquaculture Society Meeting* September 24-28 2007, Vigo (Spain).
- Garrido, D., Suau, A., Pochart, P., Cruchet, S. and Gotteland, M. (2005). Modulation of the fecal microbiota by the intake of a *Lactobacillus johnsonii* La1-containing product in human volunteers. *FEMS Microbiology Letters* **248**, 249-256.
- Gatesoupe, F. J. (1982). Nutritional and antibacterial treatments of live food organisms: The influence on survival, growth and weaning success of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Annales de Zootechnie* **31**, 353-368.
- Gatesoupe, F. J. (1991). The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* **96**, 335-342.
- Gatesoupe, F. J. (1994). Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. *Aquatic Living Resources* **7**, 277-282.
- Gatesoupe, F. J. (1997). Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources* **10**, 239-246.
- Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* **180**, 147-165.
- Gatesoupe, F. J. (2005). Probiotics and prebiotics for fish culture, at the parting of the ways. *Aqua Feeds: Formulation & Beyond* **2**, 3-5.
- Gatta, P. P., Parma, L., Guarniero, I., Mandrioli, L., Sirri, R., Fontanillas, R. and Bonaldo, A. (2010). Growth, feed utilization and liver histology of juvenile common sole (*Solea solea* L.) fed isoenergetic diets with increasing protein levels. *Aquaculture Research*, no-no.
- Gavaia, P. J. (2008). Skeletal evaluation in early stages of *Solea senegalensis*. In *IV International Sole Workshop*, November 14-17, Faro (Portugal).
- Gavaia, P. J., Dinis, M. T. and Cancela, M. L. (2002). Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* **211**, 305-323.
- Gebauer, S. K., Psota, T. L., Harris, W. S. and Kris-Etherton, P. M. (2006). n-3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *American Journal of Clinical Nutrition* **83**, S1526-1535.

- Ghittino, C., Latini, M., Agnetti, F., Panzieri, C., Lauro, L., Ciappelloni, R. and Petracca, G. (2003). Emerging Pathologies in Aquaculture: Effects on Production and Food Safety. *Veterinary Research Communications* **27**, 471-479.
- Ghosh, S., Sinha, A. and Sahu, C. (2007). Dietary probiotic supplementation in growth and health live-bearing ornamental fishes. *Aquaculture Nutrition* **14**, 289-299.
- Gildberg, A., Johansen, A. and Bøgwald, J. (1995). Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture* **138**, 23-34.
- Gildberg, A. and Mikkelsen, H. (1998). Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture* **167**, 103-113.
- Gill, H. S. (2003). Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **17**, 755-773.
- Gisbert, E., Ortiz-Delgado, J. B. and Sarasquete, C. (2008). Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. *Histology and Histopathology* **23**, 1525-1539.
- Glencross, B. D., Booth, M. and Allan, G. L. (2007). A feed is only as good as its ingredients- a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition* **13**, 17-34.
- Glencross, B. D., Hawkins, W. E. and Curnow, J. G. (2003). Restoration of the fatty acid composition of red seabream (*Pagrus auratus*) using a fish oil finishing diet after grow-out on plant oil based diets. *Aquaculture Nutrition* **9**, 409-418.
- Gomes, L. C., Brinn, R. P., Marcon, J. L., Dantas, L. A., Brandao, F. R., Abreu, J. S. D., Lemos, P. E. M., McComb, D. M. and Baldisserotto, B. (2009). Benefits of using the probiotic Efinol L during transportation of cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* (Schultz), in the Amazon. *Aquaculture Research* **40**, 157-165.
- Gomes, L. C., Brinn, R. P., Marcon, J. L., Dantas, L. A., Brandao, F. R., Sampaio De Abreu, J., McComb, D. M. and Baldisserotto, B. (2008). Using Efinol®L during transportation of marbled hatchetfish, *Carnegiella strigata* (Günther). *Aquaculture Research* **39**, 1292-1298.
- Gómez, G. D. and Balcázar, J. L. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **52**, 145-154.
- Gram, L., Løvold, T., Nielsen, J., Melchiorson, J. and Spanggaard, B. (2001). In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture* **199**, 1-11.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I. and Nielsen, T. F. (1999). Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 969-973.
- Grasman, K. A., Armstrong, M., Hammersley, D. L., Scanlon, P. F. and Fox, G. A. (2000). Geographic variation in blood plasma protein concentrations of young herring gulls (*Larus argentatus*) and Caspian terns (*Sterna caspia*) from the Great Lakes and Lake Winnipeg. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*

125, 365-375.

- Guerreiro, I., Peres, H., Castro-Cunha, M. and Oliva-Teles, A. (2010). Effect of dietary protein/lipid level on performance of senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles reared at two different temperatures. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 542-543.
- Guzmán, J. M., Norberg, B., Ramos, J., Mylonas, C. C. and Mañanós, E. L. (2008). Vitellogenin, steroid plasma levels and spawning performance of cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *General and Comparative Endocrinology* **156**, 285-297.
- Harbige, L. S. (2003). Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids* **38**, 323-341.
- Hashim, R. and Mat-Saat, M. A. (1992). The utilization of seaweed meals as binding agents in pelleted feeds for snakehead (*Channa striatus*) fry and their effects on growth. *Aquaculture* **108**, 299-308.
- Hebb, C. D., Castell, J. D., Anderson, D. M. and Batt, J. (2003). Growth and feed conversion of juvenile winter flounder (*Pleuronectes americanus*) in relation to different protein-to-lipid levels in isocaloric diets. *Aquaculture* **221**, 439-449.
- Hernández, M. D. and García-García, B. (2004). Differences in muscle fatty acid composition between reared and wild senegalensis sole (*Solea senegalensis*). In *European Aquaculture Society Meeting*, October 20-23 2004, Barcelona (Spain). pp. 412-413.
- Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E. and Shimizu, S. (2002). Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **7**, 252-262.
- Hirono, I., Nam, B.-H., Enomoto, J., Uchino, K. and Aoki, T. (2003). Cloning and characterisation of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. *Fish & Shellfish Immunology* **15**, 63-70.
- Hjelm, M., Bergh, O., Riaza, A., Nielsen, J., Melchiorson, J., Jensen, S., Duncan, H., Ahrens, P., Birbeck, H. and Gram, L. (2004). Selection and Identification of Autochthonous Potential Probiotic Bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) Rearing Units. *Systematic and Applied Microbiology* **27**, 360-371.
- Howell, B., Cañavate, J. P., Prickett, R. and Conceicao, L. E. C. (2006). Farming soles a reality at last? *Aquaculture European World Aquaculture* **37**, 3-6.
- Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K. F., Rossen, L., Nielsen, T. and Gram, L. (2004). Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* **96**, 117-132.
- Huttenhuis, H. B. T., Ribeiro, A. S. P., Bowden, T. J., Van Bavel, C., Taverne-Thiele, A. J. and Rombout, J. H. W. M. (2006). The effect of oral immuno-stimulation in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish and Shellfish Immunology* **21**, 261-271.
- Ibeas, C., Cejas, J., Gómez, T., Jerez, S. and Lorenzo, A. (1996). Influence of dietary n - 3 highly unsaturated fatty acids levels on juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth and tissue fatty acid composition. *Aquaculture* **142**, 221-235.

- Ibeas, C., Izquierdo, M. S. and Lorenzo, A. (1994). Effect of different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **127**, 177-188.
- Imstrand, A. K., Foss, A., Conceicao, L. E. C., Dinis, M. T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P. and White, P. (2003). A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **13**, 379-408.
- Irianto, A. and Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* **25**, 633-642.
- Irianto, A. and Austin, B. (2003). Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* **26**, 59-62.
- Iwama, G. K., McGeer, J. C. and Pawluk, M. P. (1989). The effects of five fish anesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol and adrenaline in rainbow trout. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **67**, 2065-2073.
- Izquierdo, M. S. (1999). Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* **2**, 183-191.
- Izquierdo, M. S. (2005). Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. *Cahiers Options Méditerranéennes* **63**, 91-102.
- Izquierdo, M. S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Rosenlund, G. and Ginés, R. (2005). Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* **250**, 431-444.
- Izquierdo, M. S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L. and Rosenlund, G. (2003). Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquaculture Nutrition* **9**, 397-407.
- Jauncey, K. and Ross, B. (1982). *A Guide to Tilapia Feeds and Feeding*. Stirling (Scotland): University of Stirling, (Scotland).
- Jouven, X., Charles, M. A., Desnos, M. and Ducimetière, P. (2001). Circulating nonesterified fatty acid level as a predictive risk factor for sudden death in the population. *Circulation* **104**, 756-761.
- Keppler, D. and Decker, K. (1974). Glycogen. Determination with amyloglucosidase. In *Methods in enzymatic analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.). New York: Academic Press.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lagan, M. J. and Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* **274**, 1-14.
- Khuntia, A. and Chaudhary, L. C. (2002). Performance of male cross-bred calves as influenced by substitution of grain by wheat bran and the addition of lactic acid bacteria to diet. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **15**, 188-194.
- Kim, D.-H. and , A., B. (2006). Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **114**, 297-304.
- Kim, D. H. and Austin, B. (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish & Shellfish Immunology* **21**, 513-524.

- Kim, K.-D., Lee, S.-M., Park, H. G., Bai, S. G. and Lee, Y.-H. (2002). Essentiality of Dietary n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids in Juvenile Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of the World Aquaculture Society* **33**, 432-440.
- Kiron, V., Fukuda, H., Takeuchi, T. and Watanabe, T. (1995). Essential fatty acid nutrition and defence mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **111**, 361-367.
- Kollner, B. and Kotterba, G. (2002). Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunisation with *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology* **12**, 35-48.
- Konstantinov, S. R., Zhu, W.-Y., Williams, B. A., Tamminga, S., de Vos, W. M. and Akkermans, A. D. L. (2003). Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiology Ecology* **43**, 225-235.
- Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Weiss, R., Harel, M., Behrens, P. and Tandler, A. (2001). The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* **193**, 107-122.
- Koven, W. M., Henderson, R. J. and Sargent, J. R. (1994). Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*). I: Lipid class and fatty acid composition of digesta from different segments of the digestive tract. *Fish Physiology and Biochemistry* **13**, 69-79.
- Kozasa, D. and Wolter, R. (1986). Les probiotiques pour demain. *Revue de l'Alimentation animal* **5**, 34-39.
- Kubota, S., Kimura, M. and Egusa, S. (1970). Studies on bacterial tuberculoidosis in cultured yellowtail. I. Symptomatology and histopathology. *Fish Pathology* **4**, 111-118.
- Kuz'mina, V. V. (2008). Classical and modern concepts in fish digestion. In *Feeding and digestive functions of fishes* (Cyrino, J. E. P., Bureau, D. P. and Kapoor, B. G., eds.), pp. 85-104.
- Lall, S. P. (2000). Nutrition and health of fish. *Avances en Nutrición Acuicola. V Symposium Internacional de Nutrición Acuicola. Mérida, Yucatán, México 19-22*.
- Lall, S. P. and Lewis-McCrea, L. K. (2007). Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish -- An overview. *Aquaculture* **267**, 3-19.
- Lambert, P. A. (1988). Enterobacteriaceae: composition, structure and function of the cell envelope. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series* **S19**, 21S-33S.
- Landolt, M. L. (1989). The relationships between diet and immune response of fish. *Aquaculture* **79**, 193-206.
- Leaf, A. (2001). Plasma nonesterified fatty acid concentration as a risk factor for sudden cardiac death: the Paris prospective study. *Circulation* **104**, 744-745.
- Lee, J. K., Cho, S. H., Park, S. U., Kim, K.-D. and Lee, S.-M. (2003a). Dietary protein requirement for young turbot (*Scophthalmus maximus*, L.). *Aquaculture Nutrition* **9**, 283-286.

- Lee, S.-M., Lee, J. H. and Kim, K.-D. (2003b). Effect of dietary essential fatty acids on growth, body composition and blood chemistry of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture* **225**, 269-281.
- Lepage, G. and Roy, C. C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research* **27**, 114-120.
- Li, P. and Gatlin, M. (2006). Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. *Aquaculture* **251**, 141-152.
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J. and Wu, G. (2009). New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* **37**, 43-53.
- Lim, C. and Webster, C. D. (2001). *Nutrition and Fish Health*. Binghamton-New York (USA): Haworth Press.
- Lin, H. Z., Guo, Z., Yang, Y., Zheng, W. and Li, Z. J. (2004). Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research* **35**, 1441-1447.
- Lin, J. H. Y., Chen, T. Y., Chen, M. S., Chen, H. E., Chou, R. L., Chen, T. I., Su, M. S. and Yang, H. L. (2006). Vaccination with three inactivated pathogens of cobia (*Rachycentron canadum*) stimulates protective immunity. *Aquaculture* **255**, 125-132.
- Lin, S. H., Davidson, G. A., Secombes, C. J. and Ellis, A. E. (2000). Use of a lipid-emulsion carrier for immunisation of dab (*Limanda limanda*) by bath and oral routes: an assessment of systemic and mucosal antibody responses. *Aquaculture* **181**, 11-24.
- Liu, J., Caballero, M. J., Izquierdo, M., El-Sayed Ali, T., Hernández-Cruz, C. M., Valencia, A. and Fernández-Palacios, H. (2002). Necessity of dietary lecithin and eicosapentaenoic acid for growth, survival, stress resistance and lipoprotein formation in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Fisheries Science* **68**, 1165-1172.
- Liu, P. V. (1957). Survey of hemolysin production among species of *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology* **74**, 718-727.
- Lobo, C., Banda, I. G. d. I., Martín, I., Tapia-Paniagua, S., Moriñigo, M. A., León-Rubio, J. M., Chabrilón, M., Arijo, S., Pazos, G., Canteras, J. C. and Moreno-Ventas, X. (2009). Influencia del probiótico Pdp11 (*Shewanella putrefaciens*) en el cultivo larvario y destete del lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). In *XII Spanish Aquaculture Society Meeting*, November 24-26 2009, Madrid (Spain).
- Lobo, C., García de la Banda, I., León-Rubio, J. M., Moriñigo, M. A., Arijo, S., Moreno-Ventas, X. and Canteras, J. C. (2010). Pdp11 *Shewanella* probiotic addition on larval senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup) culture. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 729-730.
- López-Bote, C. J., Diez, A., Corraze, G., Arzel, J., Alvarez, M., Dias, J., Kaushik, S. J. and Bautista, J. M. (2001). Dietary protein source affects the susceptibility to lipid peroxidation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle. *Animal Science* **73**, 443-449.
- Low, C., Wadsworth, S., Burrells, C. and Secombes, C. J. (2003). Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet. *Aquaculture* **221**, 23-40.
- Magariños, B., Romalde, J. L., López-Romalde, S., Moriñigo, M. A. and Toranzo, A. E. (2003). Pathobiological characterisation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

- isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **23**, 183-190.
- Magariños, B., Romalde, J. L., Santos, Y., Casal, J. F., Barja, J. L. and Toranzo, A. E. (1994). Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. *Aquaculture* **120**, 201-208.
- Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology* **20**, 137-151.
- Makridis, P., Martins, S., Dionisio, L. C., Tsalavouta, M., Kotoulas, G. and Dinis, M. T. (2004). Use of probiotics in the rearing of sea bream (*Sparus aurata*) and senegalese sole (*Solea senegalensis*). In *European Aquaculture Society Meeting*, October 20-23 2004, Barcelona (Spain). pp. 520-521.
- Makridis, P., Martins, S., Reis, J. and Dinis, M. T. (2008). Use of probiotic bacteria in the rearing of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture Research* **39**, 627-634.
- Makridis, P., Martins, S., Vercauteren, T., Driessche, K. V., Decamp, O. and Dinis, M. T. (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.
- Mancera, J. M., Arjona, F. J., Vargas-Chacoff, L., Ruíz-Jarabo, I., Wunderick, Y., Martos, J. A. and Río, M. P. M. d. (2008). What do we know about the osmorregulatory system of *Solea senegalensis*? In *IV International Sole Workshop*, November 14-17, Faro (Portugal).
- Manchado, M., Infante, C., Asensio, E. and Cañavate, J. P. (2007). Differential gene expression and dependence on thyroid hormones of two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Gene* **400**, 1-8.
- Manchado, M., Infante, C., Asensio, E., Crespo, A., Zuasti, E. and Cañavate, J. P. (2008). Molecular characterization and gene expression of six trypsinogens in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) during larval development and in tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **149**, 334-344.
- Manchado, M., Infante, C., Rebordinos, L. and Cañavate, J. P. (2009). Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of thyroid hormone receptors in Senegalese sole. *General and Comparative Endocrinology* **160**, 139-147.
- Mañanós, E., Guzmán, J. M., Ramos, J., Mylonas, C. C., Zohar, J., Peleteiro, J. B., Chereguini, O., Duncan, N., Sarasquete, C. and Riaza, A. (2008). Hormonal stimulation of ovulation, spermiation and spawning in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstock. In *IV International Sole Workshop* November 14-17 Faro (Portugal).
- Martín-Antonio, B., Manchado, M., Infante, C., Zerolo, R., Labella, A., Alonso, C. and Borrego, J. J. (2007). Intestinal microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes. *Aquaculture Research* **38**, 1213-1222.

- Martín, I., Rodríguez, C. and Chereguini, O. (2007). Puestas naturales de lenguado senegalés, salvajes y cultivados (generación F1), obtenidos por manipulación del termoperiodo en Cantabria. In *XI Spanish Aquaculture Society Meeting*, September 24-28 2007, Vigo (Spain).
- Martínez-Manzanares, E., Tapia-Paniagua, S., Balebona, M. C., Banda, I. G. d. l., Lobo, C. and Moriñigo, M. A. (2008). Influence of probiotic microorganisms on the microbiota of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) specimens. In *IV International Sole Workshop*, November 11-14, Faro (Portugal).
- Martins, D. A., Valente, L. M. P. and Lall, S. P. (2007). Effects of dietary lipid level on growth and lipid utilization by juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.). *Aquaculture* **263**, 150-158.
- Matty, A. J. (1989). Diets at the larval stage. *Fish farming international*, 32.
- Mazurkiewicz, J., Przybył, A. and Golski, J. (2008). Usability of Fermacto prebiotic in feeds for common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry. *Nauka Przyroda Technologie* **2**, 1-9.
- Mazza, M., Pomponi, M., Janiri, J., Bria, P. and Mazza, S. (2006). Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: An overview. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **31**, 12-26.
- McIntosh, D. and Austin, B. (1996). The validity of Western blotting for the diagnosis of bacterial kidney disease based on the detection of the p57 antigen of *Renibacterium salmoninarum*. *Journal of Microbiological Methods* **25**, 329-335.
- McIntosh, D., Baijing, J., Forward, B. S., Puvanendran, V., Boyce, D. and Ritchie, R. (2008). Culture-independent characterization of the bacterial populations associated with cod (*Gadus morhua* L.) and live feed at an experimental hatchery facility using denaturing gradient gel electrophoresis. *Aquaculture* **275**, 42-50.
- Medina, A., León-Rubio, J. M., Tapia-Paniagua, S. T. and Arijo, S. (2010). Identification of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* proteins involve in specific immune response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 803-804.
- Menoyo, D., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Ginés, R., López-Bote, C. J. and Bautista, J. M. (2004). Adaptation of lipid metabolism, tissue composition and flesh quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to the replacement of dietary fish oil by linseed and soyabean oils. *British Journal of Nutrition* **92**, 41-52.
- Mercasa (2010). Informe 2009 sobre producción, industria, distribución y consumo de alimentación en España. pp. 50-64: Mercasa.
- Merrifield, D. L., Bradley, G., Harper, G. M., Baker, R. T. M., Munn, C. B., Davies, S. J., and ., A. N. i. p. (2011). Assessment of the effects of vegetative and lyophilised *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilisation, intestinal colonisation and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Nutrition* **17**, 73-79.
- Merrifield, D. L., Burnard, D., Bradley, G., Davies, S. J. and baker, R. T. M. (2009). Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research* **40**, 1064-1072.

- Merrifield, D. L., Dimitrioglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T. M., Bogwald, J., Castex, M. and Ringo, E. (2010a). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* **302**, 1-18.
- Merrifield, D. L., Harper, G., Baker, R. T. M., Ringø, E. and Davies, S. J. (2010b). Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquaculture Research* **41**, 1268-1272.
- Montero, D., Grasso, V., Izquierdo, M. S., Ganga, R., Real, F., Tort, L., Caballero, M. J. and Acosta, F. (2008). Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Effects on hepatic Mx expression and some immune parameters. *Fish & Shellfish Immunology* **24**, 147-155.
- Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M. J. and Izquierdo, M. S. (2003). Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Proceedings Of The 10th International Symposium On Nutrition And Feeding In Fish (Feeding For Quality)*. **225**, 353-370.
- Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Gin, R. and Izquierdo, M. S. (2005). Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: A time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet. *Aquaculture* **248**, 121-134.
- Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Ginés, R. and Izquierdo, M. S. (2005). Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: A time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet. In *11th International Symposium on Nutrition and Feeding in Fish*, May 2-7 2004, Phuket Island, Thailand. pp. 121-134.
- Morais, S., Caballero, M. J., Conceicao, L. E. C., Izquierdo, M. S. and Dinis, M. T. (2006a). Dietary neutral lipid level and source in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae: Effect on growth, lipid metabolism and digestive capacity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **144**, 57-69.
- Morais, S., Koveb, W., Rønnestad, I., Dinis, M. T. and Conceicao, L. E. C. (2005a). Dietary protein/lipid ratio affects growth and amino acid and fatty acid absorption and metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture* **246**, 347-357.
- Morais, S., Koven, W., Rønnestad, I., Dinis, M. T. and Conceicao, L. E. C. (2005b). Dietary protein:lipid ratio and lipid nature affects fatty acid absorption and metabolism in a teleost larva. *British Journal of Nutrition* **93**, 813-820
- Morais, S., Narciso, L., Dores, E. and Pousao-Ferreira, P. (2004). Lipid enrichment for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae: effect on larval growth, survival and fatty acid profile. *Aquaculture International* **12**, 281-298.
- Morais, S., Torten, M., Nixon, O., Lutzky, S., Conceicao, L. E. C., Dinis, M. T., Tandler, A. and Koven, W. (2006b). Food intake and absorption are affected by dietary lipid level and lipid source in seabream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **331**, 51-63.
- Moriarty, D. J. W. (1998). Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* **164**, 351-358.

- Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y. and Imanaka, T. (1993). A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *Journal of Bacteriology* **175**, 6459-6466.
- Munro, P. D., Barbour, A. and Birkbeck, T. H. (1994). Comparison of the gut bacterial flora of start-feeding larval turbot reared under different conditions. *Journal of Applied Microbiology* **77**, 560-566.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology* **59**, 695-700.
- Nagano, I., Inoue, S., Kawai, K. and Oshima, S. I. (2009). Repeatable immersion infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* reproducing clinical signs and moderate mortality. *Fisheries Science* **75**, 707-714.
- Naidu, A. S., Bidlack, W. R. and Clemens, R. A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **39**, 13-126.
- Namba, A., Mano, N. and Hirose, H. (2007). Phylogenetic analysis of intestinal bacteria and their adhesive capability in relation to the intestinal mucus carp. *Journal of Applied Microbiology* **102**, 1307-1317.
- Nayak, S. K., Swain, P. and Mukherjee, S. C. (2007). Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish & Shellfish Immunology* **23**, 892-896.
- Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the world*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Nelson, M. M., Leighton, D. L., Phleger, C. F. and Nichols, P. D. (2002). Comparison of growth and lipid composition in the green abalone, *Haliotis fulgens*, provided specific macroalgal diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **131**, 695-712.
- Neumann, N. F., Stafford, J. L., Barreda, D., Ainsworth, A. J. and Belosevic, M. (2001). Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Development & Comparative Immunology* **25**, 807-825.
- Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A. A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J. and Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1699-1706.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Bylund, G., Salminen, S. and Lilius, E.-M. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish & Shellfish Immunology* **15**, 443-452.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S. and Bylund, G. (2001). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture* **198**, 229-236.
- Norum, K. R. (2004). Fish and human health. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 20-23 2004, Barcelona (Spain). pp. 49-50.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W. and Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymixa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* **178**, 5636-5643.

- Oiestad, V. and Sparboe, L. O. (2008). Economic calculations for a 100 tons production unit for Senegal sole in Shallow Raceway System (SRS) with water recirculation (RAS). In *IV International Sole Workshop* November 14-17 Faro (Portugal).
- Olmedo, M., Peleteiro, J. B., Cal, R., Álvarez-Blázquez, B., Gómez, C. and Linares, F. (2007). Reproducción y cultivo larvario de lenguado, *Solea senegalensis*, en el Centro Oceanográfico de Vigo. In *XI Spanish Aquaculture Society Meeting*, September 24-28 2007, Vigo (Spain).
- Olmedo, M., Peleteiro, J. B., Cal, R. and Linares, F. (2003). Crecimiento de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858) en Galicia. In *IX Spanish Aquaculture Society Meeting*, May 12-16 2003, Cádiz (Spain). pp. 383-385.
- Olsen, R. E., Dragnes, B. T., Myklebust, R. and Ringo, E. (2003). Effect of soybean oil and soybean lecithin on intestinal lipid composition and lipid droplet accumulation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Fish Physiology and Biochemistry* **29**, 181-192.
- Olsen, R. E., Myklebust, R., Kaino, T. and Ringo, E. (1999). Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) fed linseed oil and soybean lecithin. *Fish Physiology and Biochemistry* **21**, 35-44.
- Olsen, R. E., Myklebust, R., Ringo, E. and Mayhew, T. M. (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.
- Olsson, J. C., Westerdahl, A., Conway, P. L. and Kjelleberg, S. (1992). Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*)- associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum* *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 551-556.
- Padrós, F., Zarza, C., Estévez, A., Crespo, S. and Furones, M. D. (2003). La patología como factor limitante para el desarrollo del cultivo del lenguado. In *IX Spanish Aquaculture Society Meeting*, May 12-16 2003, Cádiz (Spain). pp. 343-345.
- Pagkalos, V. A., Moschandreas, J., Kiriakakis, M., Roussomoustakaki, M., Kafatos, A. and Kouromalis, E. (2009). Fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue and gastric mucosa: is there a relationship with gastric ulceration? *BMC Gastroenterology* **23**, 1-9.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. and Sugita, H. (2004). Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **102**, 379-388.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S. and Sugita, H. (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **243**, 241-254.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., Puangkaew, J. and Aoki, T. (2007). Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Developmental & Comparative Immunology* **31**, 372-382.
- Paulsen, S. M., Engstad, R. E. and Robertsen, B. (2001). Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* **11**, 23-37.

- Peeters, M. and Rodríguez, J. (1999). Problemas bacterianos en la industria camaronera ecuatoriana, prácticas de manejo y alternativas de control. *El Mundo Acuícola* **5**, 13-18.
- Peleteiro, J. B., Cobián, A., Olmedo, M., Álvarez, F., Álvarez-Blázquez, B., Cal, R. M. and Aguilar, Q. (2005). Estudios preliminares para la determinación del sexo y evolución de la madurez del ovario en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) utilizando técnicas ultrasonido. In *X Spanish Aquaculture Society Meeting*, October 17-21 2005, Gandía (Spain).
- Peleteiro, J. B., Rodríguez-Villanueva, J. L., Escorcio, C., Álvarez-Blázquez, B., Bacelar, M., Linares, F., Saavedra, M. J., Cal, R. M., Magadán, S. and Valente, L. M. P. (2010). Is recirculation the system for senegal sole (*Solea senegalensis*) culture? Comparison of two culture systems using a control diet and a plant-based diet until market size. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 986-987.
- Peres, H., Pérez-Jiménez, A., Rubio, V. and Oliva-Teles, A. (2010). Role of white tea and methionine supplements on growth, body composition and oxidative stress defences of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9, Porto (Portugal).
- Pérez-Gutiérrez, R. M. (2005). Actividad antimicrobiana de ácidos grasos aislados de *Tubifex tubifex*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **36**, 5-10.
- Picchietti, S., Mazzini, M., Taddei, A. R., Renna, R., Fausto, A. M., Mulero, V., Carnevali, O., Cresci, A. and Abelli, L. (2007). Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: Immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish & Shellfish Immunology* **22**, 57-67.
- Pieters, N., Brunt, J., Austin, B. and Lyndon, A. R. (2008). Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* **105**, 723-732.
- Piñeiro-Vidal, M., Carballas, C. G., Gomez-Barreiro, O., Riaza, A. and Santos, Y. (2008a). *Tenacibaculum soleae* sp. nov., isolated from diseased sole (*Solea senegalensis* Kaup). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 881-885.
- Piñeiro-Vidal, M., Centeno-Sestelo, G., Riaza, A. and Santos, Y. (2007). Isolation of pathogenic *Tenacibaculum maritimum* related organisms from diseased turbot and sole cultured in the Northwest of Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **27**, 29-35.
- Piñeiro-Vidal, M., Riaza, A. and Santos, Y. (2008b). *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 21-25.
- Planas, M., Pérez-Lorenzo, M., Hjelm, M., Gram, L., Fiksdal, I. U., Bergh, O. and Pintado, J. (2006). Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio (Listonella) anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture* **255**, 323-333.

- Pond, M. J., Stone, D. M. and Alderman, D. J. (2006). Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **261**, 194-203.
- Poussao-Ferreira, P. (2008). Status research and production of sole (*Solea senegalensis*) at IPIMAR - Aquaculture Research Center. In *IV International Sole Workshop*, November 14-17 Faro (Portugal).
- Prathepa, V. and Sukumaran, N. (2010). A study on the immunostimulant action of *Aegle marmelos* leaf on *Pseudomonas fluorescens* infected *Cyprinus carpio*. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 Porto (Portugal).
- Psota, T. L., Gebauer, S. K. and Kris-Etherton, P. (2006). Dietary Omega-3 Fatty Acid Intake and Cardiovascular Risk. *The American journal of cardiology* **98**, 3-18.
- Quentel, C., Gatesoupe, F. J., Lamour, F., Abiven, A., Baud, M., Aubin, J. and Fish, t. S. o. (2004). Effects of oral administration of probiotics on the resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, against *Yersinia ruckeri*: asymptomatic carriers and humoral immune parameters. In *6th Symposium on Fish Immunology*, May 26-29, Åbo/Turku (Finland). p. 60.
- Radu, S., Ahmad, N., Ling, F. H. and Reezal, A. (2003). Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology* **81**, 261-266.
- Raida, M. K., Larsen, J. L., Nielsen, M. E. and Buchmann, K. (2003). Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *Journal of Fish Diseases* **26**, 495-498.
- Raj, A. J. A., Suresh, A. V., Marinuthu, K. and Appelbaum, S. (2008). Probiotic Performance on Fish Fry during Packing, Transportation Stress and Post-transportation Condition. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* **3**, 152-157.
- Ramírez-Expósito, M. J., García, M. J., Mayas, M. D., Ramírez, M. and Martínez-Martos, J. M. (2002). Effects of exogenous fatty acids and cholesterol on aminopeptidase activities in rat astroglia. *Cell Biochemistry and Function* **20**, 285-290.
- Ramírez-Santana, C., Pérez-Cano, F. J., Castellote, C., Castell, M., Rivero, M., Rodríguez-Palmero, M. and Franch, A. (2009). Higher immunoglobulin production in conjugated linoleic acid-supplemented rats during gestation and suckling. *British Journal of Nutrition* **102**, 858-868.
- Rasines, I., Chereguini, O., Rodríguez, C., Linares, F., Pazos, G. and Martín, I. (2007). Composición bioquímica de las puestas de lenguado senegalés en cautividad. In *XI Spanish Aquaculture Society Meeting*, September 24-28 2007, Vigo (Spain).
- Rasines, I., Gómez, M., Rodríguez, C., Martín, I. and Chereguini, O. (2009). Calidad de las puestas inducidas hormonalmente en relación con la hora de ovulación y el momento del masaje abdominal en lenguado senegalés. In *XII Spanish Aquaculture Society Meeting*, November 24-26 2009, Madrid (Spain).
- Regost, C., Arzel, J., Robin, J., Rosenlund, G. and Kaushik, S. J. (2003). Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*): 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture* **217**, 465-482.

- Rengpipat, S., Rueangruklikhit, T. and Piyatiratitivorakul, S. (2008). Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. *Aquaculture Research* **39**, 134-143.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C. and Dinis, M. T. (1999). Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* **179**, 465-473.
- Richard, N., Cordeiro, O., Silva, T. S., vareilles, M. d., Alves, R. N., Costas, B., Wulff, T., Rodrigues, P. M. and Conceicao, L. E. C. (2010). Effects of amino acid supplementation on liver proteome of Senegalese sole juveniles exposed to handling stress. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 1101-1102.
- Richard, N., Gavaia, P. J. and Cordeiro, O. (2008). Dietary Vitamin K supplementation and expression of proteins involved in skeleton development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). In *XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding*, June 1-5, Florianapolis (Brasil).
- Ringo, E. (2004). Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cell and Tissue Research* **318**, 305-311.
- Ringo, E., Bendiksen, H. R., Gausen, S. J., Sundsfjord, A. and Olsen, R. E. (1998). The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 855-864.
- Ringo, E., Birkbeck, T. H., Munro, P. O., Vadstein, O. and Hjelmeland, K. (2008). The effect of early exposure to *Vibrio Pelagius* on the aerobic bacterial flora of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) larvae. *Journal of Applied Microbiology* **81**, 207-211.
- Ringo, E. and Gatesoupe, F. J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* **160**, 177-203.
- Ringo, E., Lovmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., Olsen, R. E. and Mayhew, T. M. (2010). Lactic acid bacteria vs pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture Research* **41**, 451-467.
- Ringo, E., Salinas, I., Olsen, R. E., Nyhaug, A., Myklebust, R. and Mayhew, T. M. (2007). Histological changes in intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following in vitro exposure to pathogenic and probiotic bacterial strains. *Cell and Tissue Research* **328**, 109-116.
- Robaina, L., Corraze, G., Aguirre, P., Blanc, D., Melcion, J. P. and Kaushik, S. (1999). Digestibility, postprandial ammonia excretion and selected plasma metabolites in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed pelleted or extruded diets with or without wheat gluten. *Aquaculture* **179**, 45-56.
- Robaina, L., Izquierdo, M. S., Moyano, F. J., Socorro, J., Vergara, J. M. and Montero, D. (1998). Increase of the dietary n - 3/n - 6 fatty acid ratio and addition of phosphorus improves liver histological alterations induced by feeding diets containing soybean meal to gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* **161**, 281-293.
- Robaina, L., Izquierdo, M. S., Moyano, F. J., Socorro, J., Vergara, J. M., Montero, D. and Fernández-Palacios, H. (1995). Soybean and lupin seed meals as protein

- sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture* **130**, 219-233.
- Robaina, L., Moyano, F. J., Izquierdo, M. S., Socorro, J., Vergara, J. M. and Montero, D. (1997). Corn gluten and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): Nutritional and histological implications. *Aquaculture* **157**, 347-359.
- Robaina, L. and Schuchardt, D. (2009). Proteínas y dietas para peces. In *La nutrición y alimentación en piscicultura*, pp. 91-150: Fundación Observatorio Español de Acuicultura.
- Robertson, P. A. W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J. R., Zherdmant, M. and Austin, B. (1998). Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* **32**, 151-155.
- Robertson, P. A. W., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P. and Austin, B. (2000). Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* **185**, 235-243.
- Robin, J. H. (1989). The quality of living preys for fish larval cultura: preliminary results on mineral supplementation. In *Aquaculture, a biotechnology in progress* (Paw, N. D., ed.): EAS.
- Rodiles, A., Alarcón, F. J., Herrera, M., Olmo, P., Lall, S. P., Cordero, M. L. and Hachero-Cruzado, I. (2010a). Growth, body lipid and fatty acid composition of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fed with diets partially replaced by vegetal sources. In *IX International Congress on the Biology of Fish*, July 5-7, Barcelona (Spain).
- Rodiles, A., Hachero-Cruzado, I., Herrera, M., Cañavate, J. P. and Alarcón, F. J. (2008). Studies on the utilization of dietary protein and energy in juvenile Senegalese sole. In *IV International Sole Workshop*, November 14-17 Faro (Portugal).
- Rodiles, A., Hachero-Cruzado, I., Herrera, M., Lall, S. P. and Alarcón, F. J. (2009a). Sustitución parcial de la harina de pescado por harinas vegetales en piensos para juveniles de *S. senegalensis*: efecto sobre el crecimiento y parámetros zootécnicos. In *XII Spanish Aquaculture Society Meeting*, November 24-26 2009, Madrid (Spain).
- Rodiles, A., Herrera, M., Hachero-Cruzado, I., Cordero, M. L., Lall, S. P., Martínez, T. F. and Alarcón, F. J. (2010b). Partial replacement of fish meal by plant protein sources in practical diets for juvenile senegalese sole (*Solea senegalensis*): effect on digestive proteases. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 590-591.
- Rodiles, A., Herrera, M., Hachero-Cruzado, I., Ruíz-Jarabo, I., Mancera, J. M. and Alarcón, F. J. (2009b). Efecto de la relación proteína-lípido sobre el crecimiento y parámetros metabólicos de juveniles de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). In *XII Spanish Aquaculture Society Meeting*, November 24-26 2009, Madrid (Spain).
- Rodiles, A., Martínez, S., Gómez, C., Navas, J. O., Cañavate, J. P. and Alarcón, F. J. (2007). Necesidades de proteína en juveniles de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) cultivados en régimen intensivo. In *XI Spanish Aquaculture Society Meeting*, September 24-28 2007, Vigo (Spain).
- Rodriguez-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H. and Sweetman, J. (2009). Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannanoligosaccharide and polyhydrobutyric acid on growth performance and

- immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Science* **57**, 609-617.
- Rodríguez, C., Pérez, J. A. and Henderson, R. J. (2002). The esterification and modification of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids by hepatocytes and liver microsomes of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* **132**, 559-570.
- Rodríguez, J. L., Linares, F., Souto, B. F., Canosa, C., Pazos, G. and Soto, N. (2010). Larval culture of Senegal sole, *Solea senegalensis*, in closed and open circuit. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 1122-1123.
- Rodríguez, J. L. and Souto, B. F. (2004). Growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1868) under a controlled temperature and with automatically supplied feeding. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 20-23 2004, Barcelona (Spain). pp. 687-688.
- Rodríguez, J. L., Souto, B. F. and Quintans, J. M. (2005). Preengorde de lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) bajo diferentes regímenes de alimentación. In *X Spanish Aquaculture Society Meeting*, October 17-21 2005, Gandía (Spain). pp. 246-248.
- Rodríguez, R. B. (1984). Biología y Cultivo de *Solea senegalensis* Kaup 1858 en el Golfo de Cádiz. In *Departamento de Zoología*, p. 207. Sevilla: Universidad de Sevilla.
- Rodríguez, S., Vilas, M. P., Gutiérrez, M. C., Pérez-Prieto, S. I., Sarasquete, M. C. and Rodríguez, R. B. (1997). Isolation and Preliminary Characterization of a Birnavirus from the sole *Solea Senegalensis* in Southwest Spain. *Journal of Aquatic Animal Health* **9**, 295-300.
- Rollo, A., Sulpizio, R., Nardi, M., Silvi, S., Orpianesi, C., Caggiano, M., Cresci, A. and Carnevalli, O. (2006). Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. *Fish Physiology and Biochemistry* **32**, 167-177.
- Romalde, J. L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology* **5**, 3-9.
- Roque, A., Dogankaya, L., Furones, D., Duncan, N., Salas-Leiton, E., Banda, I. G. d. I., Cañavate, J. P., Lobo, C. and Gómez-Gil, B. (2008). Analysis of the vibrios isolated from the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) cultured in three different localities of Spain. In *IV International Sole Workshop*, November 14-17, Faro (Portugal).
- Rosenfeld, W. D. and Zobell, C. E. (1947). Antibiotic production by marine microorganisms. *Journal of Bacteriology* **54**, 393-398.
- Roth, E. (2007). Immune and cell modulation by amino acids. *Clinical nutrition* **26**, 535-544.
- Rubio, V. C., Boluda Navarro, D., Madrid, J. A. and Sánchez-Vázquez, F. J. (2009). Macronutrient self-selection in *Solea senegalensis* fed macronutrient diets and challenged with dietary protein dilutions. *Aquaculture* **291**, 95-100.
- Rueda-Jasso, R., Conceicao, L. E. C., Dias, J., Coen, W. d., Gomes, E., Rees, J. F., Soares, F., Dinis, M. T. and Sorgeloos, P. (2004). Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture* **231**, 417-433.

- Sáenz de Rodrigáñez, M., Alarcón, F. J., Martínez, M. I., Ruiz, F., Díaz, M. and Moyano, F. J. (2005). Caracterización de las proteasas digestivas del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858. *Boletín Instituto Español de Oceanografía* **21**, 95-104.
- Sáenz de Rodrigáñez, M., Díaz-Rosales, P., Chabrillón, M., Smidt, H., Arijo, S., Rubio, J. M. L., Alarcón, F. J., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., Cara, J. B. and Moyano, F. J. (2009). Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition* **15**, 177-185.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* **172**, 63-92.
- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Manchado, M. and Cañavate, J. P. (2008). Growth, feeding and oxygen consumption of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles stocked at different densities. *Aquaculture* **285**, 84-89.
- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D., Planas, J. V., Infante, C., Cañavate, J. P. and Manchado, M. (2010a). Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response. *Fish & Shellfish Immunology* **28**, 296-302.
- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Rodríguez-Rúa, A. and Cañavate, J. P. (2010b). Stocking homogeneous size groups does not improve growth performance of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) juveniles: Individual growth related to fish size. *Aquaculture Engineering* **43**, 108-113.
- Salas-Leiton, E., Asensio, E., Rodríguez-Rúa, A., Hachero, I., Zerolo, R., Fernández-Díaz, C. and Cañavate, J. P. (2010c). Effect of dietary free acid content on growth and hepatic morphology in sole (*Solea senegalensis*) juveniles. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 1162-1163.
- Salinas, I., A, C., Esteban, M. A. and Meseguer, J. (2005). Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology* **19**, 67-77.
- Salinas, I., Abelli, L., Bertoni, F., Picchietti, S., Roque, A., Furones, D., Cuesta, A., Meseguer, J. and Esteban, M. A. (2008a). Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* **25**, 114-123.
- Salinas, I., Díaz-Rosales, P., Cuestas, A., Meseguer, J., Chabrillón, M., Moriñigo, M. A. and Esteban, M. A. (2006). Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology* **111**, 279-286.
- Salinas, I., Myklebust, R., Esteban, M. A., Olsen, R. E., Meseguer, J. and Ringo, E. (2008b). In vitro studies of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) foregut: Tissue responses and evidence of protection against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* epithelial damage. *Veterinary Microbiology* **128**, 167-177.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y. and Lee, Y. K. (1999). Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science & Technology* **10**, 107-110.

- Salvesen, I., Reitan, K. I., Skjermo, J. and Oie, G. (2000). Microbial environments in marine larviculture: Impacts of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. *Aquaculture International* **8**, 275-287.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanguinetti, C. J., Dias Neto, E. and Simpson, A. J. G. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* **17**, 915-919.
- Santos, Y. (2008). Tenacibaculosis in fish: effect of vaccination on immune response and protection. In *IV International Sole Workshop*, November 14-17, Faro (Portugal).
- Sarasquete, C., Canales, M. L. G. d., Arellano, J., Muñoz-Cueto, J. A., Ribeiro, L. and Dinis, M. T. (1998). Histochemical study of skin and gills of Senegal sole, *Solea senegalensis* larvae and adults. *Histology and Histopathology* **13**, 727-735.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. and Estévez, A. (1999a). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* **177**, 191-199.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estévez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. and Tocher, D. (1999b). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* **179**, 217-229.
- Sargent, J. R. (1997). Fish oils and human diet. *British Journal of Nutrition* **78**, S5-S13
- Sargent, J. R., Bell, J. G., Bell, M. V., Henderson, R. J. and Tocher, D. R. (1995). Requirements criteria for essential fatty acids. *Journal of Applied Ichthyology* **11**, 183-198.
- Satomi, M., Vogel, B. F., Gram, L. and Venkateswaran, K. (2006). *Shewanella hafniensis* sp. nov. *Shewanella morhuae* sp. isolated from marine fish of the Baltic Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 243-249.
- Satomi, M., Vogel, B. F., Venkateswaran, K. and Gram, L. (2007). Description of *Shewanella glacialipiscicola* sp. nov. and *Shewanella algidipiscicola* sp. nov., isolated from marine fish of the Danish Baltic Sea, and proposal that *Shewanella affinis* is a later heterotypic synonym of *Shewanella colwelliana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 347-352.
- Schrezenmeir, J. and Vrese, M. d. (2001). Probiotics, prebiotics and synbiotics- Approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition* **73**, 361S-364S.
- Schwarz, S. and Chaslus-Dancla, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research* **32**, 201-225.
- Secombes, C. J. (1996). The nonspecific immune system: cellular defenses. In *The Fish Immune System: organism, pathogen and environment* (Iwama, G. and Nakanishi, T., eds.), pp. 63-105. San Diego - California (USA): Academic Press.
- Sharifuzzaman, S. M. and Austin, B. (2009). Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology* **27**, 440-445.
- Silva, J. M. G., Espe, M., Conceicao, L. E. C., Dias, J., Costas, B. and Valente, L. M. P. (2010). Use of alternative protein sources in diets of Senegalese sole juveniles (*Solea*

- senegalensis*, Kaup 1858). In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 1238-1239.
- Silva, J. M. G., Espe, M., Conceicao, L. E. C., Dias, J. and Valente, L. M. P. (2009). Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) grow equally well on diets devoid of fish meal provided the dietary amino acids are balanced. *Aquaculture* **296**, 309-317.
- Simopoulos, A. P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedecine & Pharmacotherapy* **60**, 502-507.
- Sire, M. F., Lutton, C. and Vernier, J. M. (1981). New views on intestinal absorption of lipids in teleostean fishes: an ultrastructural and biochemical study in the rainbow trout. *Journal of Lipid Research* **22**, 81-94.
- Skjermo, J. and Bergh, O. (2004). High-M alginate immunostimulation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae using *Artemia* for delivery, increases resistance against vibriosis. *Aquaculture* **238**, 107-113.
- Skjermo, J., Defoort, T., Dehasque, M., Espevik, T., Olsen, Y., Skjak-brfek, G., Sorgeloos, P. and Vadstein, O. (1995). Immunostimulation of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using an alginate with high mannuronic acid content administered via the live food organism *Artemia*. *Fish & Shellfish Immunology* **5**, 531-534.
- Skretting (2005). Cultivo del lenguado. In *Skretting Informa: Trouw España* (NUTRECO).
- Slein, M. W. (1963). D-glucose, determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In *Methods in enzymatic analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.), p. 117. New York: Academic Press.
- Smith, O. K., Krohon, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76-85.
- Son, V. M., Chang, C.-C., Wu, M.-C., Guu, Y.-K., Chiu, C.-H. and Cheng, W. (2009). Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology* **26**, 691-698.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Sick, E. B., Pipper, C. B., Martinussen, T., Slierendrecht, W. J. and Gram, L. (2001). The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology* **3**, 755-765.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, K., Nielsen, T., Appel, K. F. and Gram, L. (2000). The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture* **182**, 1-15.
- Sugita, H., Fujie, T., Sagesaka, T. and Itoi, S. (2009). The effect of *Lactococcus lactis* on the abundance or aeromonads in the rearing water of the goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus). *Aquaculture Research* **41**, 153-156.
- Sugita, H. and Ito, Y. (2006). Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. *Letters in Applied Microbiology* **43**, 336-342.

- Sugita, H., Okano, R., Suzuki, Y., Iwai, D., Mizukami, M., Akiyama, N. and Matsuura, S. (2002). Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fisheries Science* **68**, 1004-1011.
- Sugita, H., Shibuya, K., Shimooka, H. and Deguchi, Y. (1996). Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture* **145**, 195-203.
- Sundh, H., Kvamme, B.-O., Fridell, F., Niklasson, L., Taranger, G. L. and Sundell, K. (2010). Intestinal barrier function as a welfare indicator of sub-optimal husbandry conditions in atlantic salmon (*Salmo salar*) aquaculture. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9, Porto (Portugal).
- Tannock, G. W. (1997). Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends in Biotechnology* **15**, 270-274.
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.-Y., Kim, S.-M., Park, S.-I., Yoshikawa, T. and Sakata, T. (2006). Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science* **72**, 755-766.
- Tapia-Paniagua, S., Chabrilion, M., Rosales, P. D., Garcia de la Banda, I., Lobo, C., Balebona, M. C. and Moriñigo, M. A. (2010a). Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbiology Ecology* **60**, 310-319.
- Tapia-Paniagua, S. T., Chabrilión, M., Ledesma, L., León-Rubio, J. M., García de la Banda, I., Lobo, C. and Moriñigo, M. A. (2009a). Effect of probiotic, *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on diversity of intestinal microbiota in farmed sole, *Solea senegalensis* larvae. In *14th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish*, September 14-19 2009, Prague (Czech Republic).
- Tapia-Paniagua, S. T., Díaz-Rosales, P., León-Rubio, J. M., Banda, I. G. d. l., Lobo, C., Alarcón, F. J., Chabrilión, M., Rosas-Ledesma, M., Varela, J. L., Ruíz-Jarabo, I., Arijo, S., Esteban, M. A., Martínez-Manzanares, E., Mancera, J. M., Balebona, M. C. and Moriñigo, M. A. (2010b). Use of probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on the culture of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*). In *IX International Congress on the Biology of Fish*, July 5-7, Barcelona (Spain).
- Tapia-Paniagua, S. T., García de la Banda, I., Lobo, C., Díaz-Rosales, P., Narváez, L., Balebona, M. C. and Moriñigo, M. A. (2009b). Analysis of gastrointestinal microbial diversity of cultured larvae and juvenile *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). In *European Aquaculture Society Meeting*, August 14-17 2009, Trondheim (Norway).
- Tapia-Paniagua, S. T., León-Rubio, J. M., García de la Banda, I., Lobo, C., Medina, A., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M. C. and Moriñigo, M. A. (2010c). Study of the intestinal microbiota of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) after oral administration of the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 801-802.
- Thompson, I., Choubert, G., Houlihan, D. F. and Secombes, C. J. (1995). The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. *Aquaculture* **133**, 91-102.
- Thyssen, A. and Ollevier, F. (2001). In vitro antimicrobial susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* to 15 different antimicrobial agents. *Aquaculture* **200**, 259-269.

- Tocher, D. R., Bell, J. G., Dick, J. R. and Crampton, V. O. (2003). Effects of dietary vegetable oil on atlantic salmon hepatocyte fatty acid desaturation and liver fatty acid compositions. *Lipids* **38**, 723-732.
- Tocher, D. R., Bendiksen, E. Å., Campbell, P. J. and Bell, J. G. (2008). The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture* **280**, 21-34.
- Toranzo, A. E., Avendaño, R., López-Vázquez, C., Magariños, B., Dopazo, C. P., Romalde, J. L. and Barja, J. L. (2003). Principales patologías bacterianas y víricas en lenguado cultivado: caracterización de agentes etiológicos. In *IX Spanish Aquaculture Society Meeting*, May 12-16 2003, Cádiz (Spain). pp. 355-357.
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J., Cahu, C., Gatesoupe, F. J., Vázquez-Juárez, R. and Lésel, R. (2002). Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* **204**, 113-123.
- Trichet, V. V. (2010). Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research* **41**, 356-372.
- Vadstein, O., Olsen, Y., Boon, N., Bergh, O., Gatesoupe, F. J., Picchietti, S., Abelli, L., Buonocore, E., Fausto, A. M., Scapigliatti, G., Galindo-Villegas, J., Mulero, V., makridis, P., Sorgeloos, P., Defoirdt, T., Dierckens, K. and Bossier, P. (2010). Microbiology and immunology in larviculture. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 230-231.
- Valente, L. M. P., Bacelar, M., Oliveira, B., Dias, J., Castro-Cunha, M. and Ozório, R. O. A. (2010a). Practical plant-based diets for Senegalese sole juveniles. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 1331-1332.
- Valente, L. M. P., Gouveia, A., Rema, P., Matos, J., Gomes, E. F. and Pinto, I. S. (2006). Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* **252**, 85-91.
- Valente, L. M. P., Linares, F., Villanueva, J. L. R., Escórcio, C., Borges, P., Álvarez-Blázquez, B., Silva, J. M. G., Espe, M., Medale, F., Cal, R. M. and Peleteiro, J. B. (2010b). Dietary protein source or energy levels have no major impact on growth performance or nutrient utilization of ongrowing Senegalese sole. In *European Aquaculture Society Meeting*, October 5-9 2010, Porto (Portugal). pp. 1333-1334.
- Varela, J. L. (2008). Efectos del probiótico Pdp11 sobre el crecimiento, parámetros metabólicos e inmunológicos de la dorada (*Sparus aurata*). In *Departamento de Biología*, p. 95. Cádiz, Spain: Universidad de Cádiz.
- Varela, J. L., Ruíz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arijo, S., León-Rubio, J. M., García-Millán, I., Río, M. P. M. d., Moriñigo, M. A. and Mancera, J. M. (2010). Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. *Aquaculture* **309**, 265-271.
- Vaseeharan, B. and Ramasamy, P. (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology* **36**, 83-87.
- Vendrell, D., Luis Balcázar, J., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Gironés, O. and Luis Múzquiz, J. (2008). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from

- lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **31**, 337-345.
- Vergio, F. (1954). Anti und Probiotika. *Hippokrates* **25**, 16-119.
- Verlhac, V. and Kiron, V. (2004). Nutrition and immune modulation in aquatic animals. *Aqua Feeds: Formulation & Beyond* **1**, 5-9.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 655-671.
- Vieira, L., Erzini, K., Bexiga, C., Sá, R. and Veiga, P. (2003). Diets of the sole *Solea vulgaris* Quensel, 1806 and *Solea senegalensis* Kaup, 1858 in the lower estuary of the Guadiana river (Algarve, Southern Portugal): preliminary results. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* **19**, 505-508.
- Villalta, M. (2007). Requerimientos nutricionales en ácidos grasos esenciales y organogénesis de la larva del lenguado senegalés, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). In *Departament de biologia animal, biologia vegetal i ecologia*. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M. P. and Bell, J. G. (2005). The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture* **249**, 353-365.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M. P. and Bell, J. G. (2008). Arachidonic acid, arachidonic/eicosapentanoic acid ratio, stearidonic acid and eicosanoids are involved in dietary-induced albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture Nutrition* **14**, 120-128.
- Villamil, L., Figueras, A., Planas, M. and Novoa, B. (2003). Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* **219**, 43-56.
- Villamil, L., Tafalla, C., Figueras, A. and Novoa, B. (2002). Evaluation of immunomodulatory effects of some lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **9**, 1318-1323.
- Vine, N. G., Leukes, W. D., Daya, S., Baxter, J. and Hecht, T. (2004a). Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases* **27**, 319-326.
- Vine, N. G., Leukes, W. D. and Kaiser, H. (2004b). In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters* **231**, 145-152.
- Vollstad, D., Bøgwald, J., Gåserød, O. and Dalmo, R. A. (2006). Influence of high-M alginate on the growth and survival of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) fry. *Fish & Shellfish Immunology* **20**, 548-561.
- Waché, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F. J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé, L. and Quentel, C. (2006). Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture* **258**, 470-478.
- Watanabe, T. (2002). Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries Science* **68**, 242-252.

- Watts, M., Munday, B. and Burke, C. M. (2001). Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal* **79**, 570-574.
- Weatherley, A. H. and Gill, H. S. (1987). *The Biology of fish growth*. London (United Kingdom): Academic Press London.
- Wilson, R. P. and Poe, W. E. (1985). Relationship of whole body and egg essential amino acid patterns to amino acid requirement patterns in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **80**, 385-388.
- Yeh, S.-P., Chang, C.-A., Chang, C.-Y., Liu, C.-H. and Cheng, W. (2008). Dietary sodium alginate administration affects fingerling growth and resistance to *Streptococcus* sp. and iridovirus, and juvenile non-specific immune responses of the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology* **25**, 19-27.
- Yilmaz, E., Akyurt, I. and Mutlu, E. (2006). Effects of energetic diets on growth, blood chemistry, and liver pathology of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* **58**, 191-197.
- Young, G. and Conquer, J. (2005). Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. *Reproduction Nutrition Development* **45**, 1-28.
- Yúfera, M., Parra, G., Santiago, R. and Carrascosa, M. (1999). Growth, carbon, nitrogen and caloric content of *Solea senegalensis* (Pisces: Soleidae) from egg fertilization to metamorphosis. *Marine Biology* **134**, 43-49.
- Zarza, C. and Padrós, F. (2008). An overview of diseases of farmed sole. In *IV International Sole Workshop*, November 14-17, Faro (Portugal).
- Zarza, C., Padrós, F. and Estévez, A. (2005). Patología del lenguado (*Solea senegalensis*). *Skretting Informa* **10**, 14-24.
- Zorrilla, I., Arijo, S., Chabrilón, M., Díaz, P., Marínez-Manzanares, E., Balebona, M. C. and Moriñigo, M. A. (2003). *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *Journal of Fish Diseases* **26**, 103-108.
- Zorrilla, I., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., Sarasquete, C. and Borrego, J. J. (1999). Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases* **22**, 167-172.

ANEXOS

ANEXO I

Composición de los piensos (Skretting) utilizados en los diferentes ensayos

Ensayo	PROBIO 1-2	PROBIO 3	PROBIO 4
Pienso	Gemma PG 1.8	LE-2 ELITE	Gemma Diamond 1.8
Proteínas (%)	50.0	57.0	55.0
Lípidos (%)	22.0	18.0	15.0
Fibra (%)	0.5	1.3	0.5
Cenizas (%)	9.0	10.7	11.0
Fósforo (%)	1.3	1.7	1.7
Humedad (%)	7.0	7.0	7.0
Harina de pescado (%)	62.0	68.0	66.5
Almidón de trigo	14.0		
Aceite de pescado (%)	15.0	11.00	7.5
Gluten de trigo (%)	8.0	12.00	10.0
Betaína (%)		0.25	
Concentrado Proteico de Soja		4.00	1
Trigo		4.75	
Almidón de maíz (%)			14.0
Ácidos grasos n-3		55.2	41.31
Ácidos grasos n-6		17.0	8.08
EPA+DHA		22.3 (EPA) 22.0 (DHA)	34.58
<i>Vitamina A IU/kg</i>	<i>15.000</i>	<i>5.000</i>	<i>12.000</i>
<i>Vitamina D3 IU/kg</i>	<i>2.250</i>	<i>750</i>	<i>900</i>
<i>Vitamina E IU/kg</i>	<i>300</i>	<i>250</i>	<i>180</i>
<i>Cobre (ppm)</i>	<i>8</i>	<i>7.5</i>	<i>8</i>
<i>Vitamina C</i>	<i>350</i>	<i>200</i>	<i>500</i>
ENERGÍA DIGESTIBLE (MJ/Kg)	20.4	19.9	19.3

ABREVIATURAS

AGS	Amiloglucosidasa
APROMAR	Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España
ARA	Ácido araquidónico, 20:4n-6
ATP	Adenosin trifosfato
BHT	2,6-Di-ter-butil-4-metilfenol
BCA	Ácido bicincónico
BSA	Albúmina de suero bovina
C ₁₈ , C ₂₀ o C ₂₂	Ácidos grasos de 18, 20 ó 22 átomos de carbono.
CO	Centro Oceanográfico
COFI	Comité de Pesca de la FAO
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
DHA	Ácido docosahexanoico, 22:6n-3
DL ₅₀	Dosis letal 50
DNA	Ácido desoxirribonucleico
16S rDNA	Subunidad ribosómica del DNA
EATIP	Plataforma Europea de Innovación y Tecnología en Acuicultura
ECPs	Productos extracelulares
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EPA	Ácido eicosapentanoico, 20:5n-3
FAO	Organización de Naciones Unidas para La Agricultura, Pesca y Alimentación
HUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
IEO	Instituto Español de Oceanografía
IFAPA	Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola de la Junta de Andalucía
Ig	Inmunoglobulina
JACUMAR	Junta Asesora de Cultivos Marinos
min	minuto
MUFAs	Ácidos grasos monoinsaturados
n-3, n-6 o n-9	Ácidos grasos de la series 3, 6 ó 9.

NAD	Nicotinamida adenín dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido (forma reducida)
NI	No identificados
OMPs	Proteínas de membrana externa
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAS	Tinción con ácido periódico de Schiff
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-T	PBS con Tween 80.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGE ₁ , PGE ₂ o PGE ₃	Prostaglandinas tipo E, series 1, 2 ó 3.
PN	Plan Nacional
PPARs	Receptores nucleares activadores de la proliferación de peroxisomas
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
RPS	Porcentaje de supervivencia relativo
SAFAs	Ácidos grasos saturados..
DAS	Ácido estearidónico, 18:4n-3.
SDS	Dodecil sulfato sódico
SGR	Tasa de crecimiento específico
subsp	Subespecie
TAG	Triglicéridos o triacilglicéridos
TCBS	Agar-tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano
TSAs	Agar tripticasa de soja enriquecido con 1,5% de CINa
TSBs	Caldo tripticasa de soja enriquecido con 1,5% de CINa
ufc	Unidades formadoras de colonias
UMA	Universidad de Málaga
v/v	volumen/volumen

