

# SELECCIÓN Y APLICACIÓN DE PROBIOTICOS PARA LA ACUICULTURA MARINA

Alma Hernández de Rojas

Grupo de investigación "Uso de Probioticos y vacunas en acuicultura"  
Instituto Español de Oceanografía – C.O. de Gijón  
[alma.hernandez@ieo.es](mailto:alma.hernandez@ieo.es)

# ¿QUIÉNES SOMOS?

## Grupo de Cultivos Marinos del Centro Oceanográfico de Santander



Instituto Español de Oceanografía  
Centro Oceanográfico de Santander



Instituto Español de Oceanografía  
Centro Oceanográfico de Santander

### GRUPO DE CULTIVOS MARINOS DEL CENTRO OCEANOGRÁFICO DE SANTANDER

Investigadores

Programa Técnico

- Reproducción del langosta senegalés y cultivos multitróficos
  - Desarrollo de técnicas de cultivo de nuevas especies.
  - Control de la reproducción.
  - Estudios de comportamiento.
  - Caracterización genética.

#### ■ **Uso de probióticos y vacunas en acuicultura**

- Aplicación y comercialización de probióticos en el cultivo (larvario, engorde y reproducción) de peces.
- Aislamiento y selección de bacterias lácticas y bacteriocinas de origen marino.
- Microbiota intestinal como eje del bienestar animal.
- Factores de virulencia expresados "in vivo" en peces en cultivo.
- Aplicación de vacunas de nueva generación en el cultivo de peces.
- Producción bacteriana de ácidos grasos w3 como nutraceuticos y promotores de una acuicultura sostenible dietas peces.
- Utilización de técnicas moleculares en acuicultura.

ÁREA DE ACUICULTURA

- Caracterización y aislamiento de patógenos en cultivos de peces y reproducción de peces.
- Aislamiento y selección de bacterias lácticas y bacteriocinas de origen marino.
- Microbiota intestinal como eje del bienestar animal.
- Factores de virulencia expresados "in vivo" en peces en cultivo.
- Aplicación de vacunas de nueva generación en el cultivo de peces.
- Producción bacteriana de ácidos grasos w3 como nutraceuticos y promotores de una acuicultura sostenible dietas peces.
- Utilización de técnicas moleculares en acuicultura.

#### ■ **Biología Molecular aplicada a la reproducción en acuicultura**

- Estudio de marcadores moleculares que afectan a la calidad genética (ADN, ARNs, epigenética).
- Desarrollo de marcadores moleculares de buenos reproductores.
- Estudio del efecto de la conservación de gametos sobre parámetros moleculares.
- Estudio del efecto de la conservación y la diferenciación in vitro de células primarias germinales en peces.
- Estudios de efectos transgeneracionales tras la reproducción parental a todos

- Asealamiento en capturas, transporte y manipulación de peces silvícolas.
- Diseño y aplicación de técnicas de producción de cultivos acuícolas (flotadores, rolletes, Actinas).
- Asealamiento en técnicas de reproducción artificial.
- Asealamiento en técnicas de conservación.
- Diseño experimental y desarrollo de dietas, alimentación y nutrición de peces: evaluación de crecimiento, calidad y sostenibilidad.
- Diseño y realización de pruebas experimentales in vivo y preclínicas de distintos fases de cultivo de peces marinos.
- Producción de huevos y larvas de langosta.
- Diseño y aplicación de técnicas de bioencapsulación probiótica en cultivos acuícolas (flotadores, rolletes, Actinas) y protocolos de administración in vivo en peces.
- Técnicas de aplicación probiótica y protocolos de administración en microencapsulados y pienso de peces.
- Diseño y aplicación de "challenges" para ensayos de respuesta inmune frente a patógenos de peces.
- Asealamiento en utilización de vacunas en dietas vísceras e inyectables para cultivo de peces.

ACUICULTURA



# ¿QUIÉNES SOMOS?



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA



Centro Oceanográfico Gijón



Planta de cultivo de Santander "El Bocal"

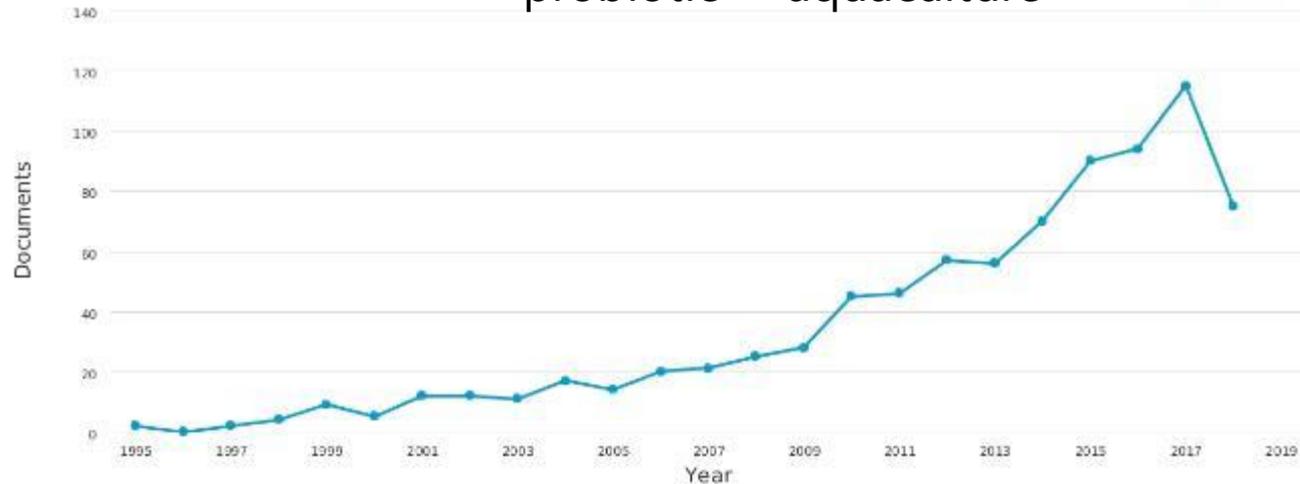


# Número de publicaciones científicas

Documents by year

"probiotic + aquaculture"

Scopus

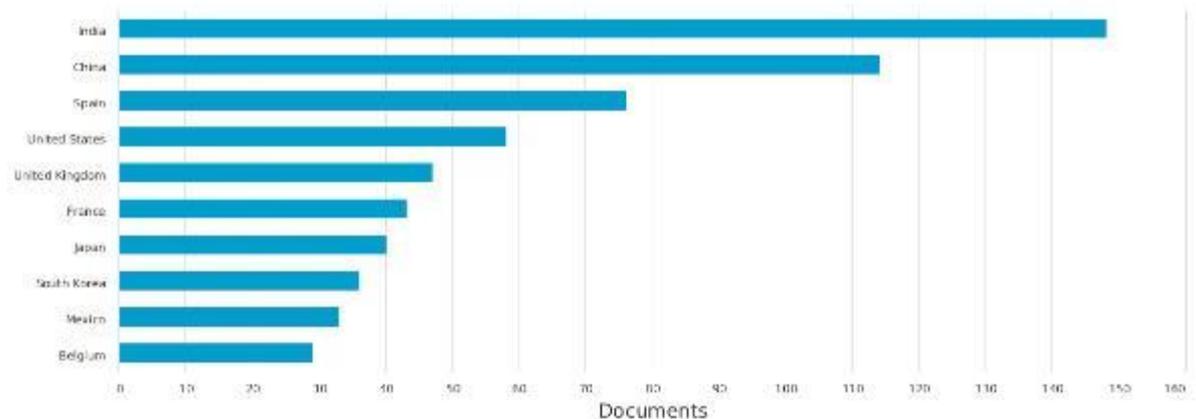


Copyright © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved. Scopus® is a registered trademark of Elsevier B.V.

Documents by country or territory

Compare the document counts for up to 15 countries/territories

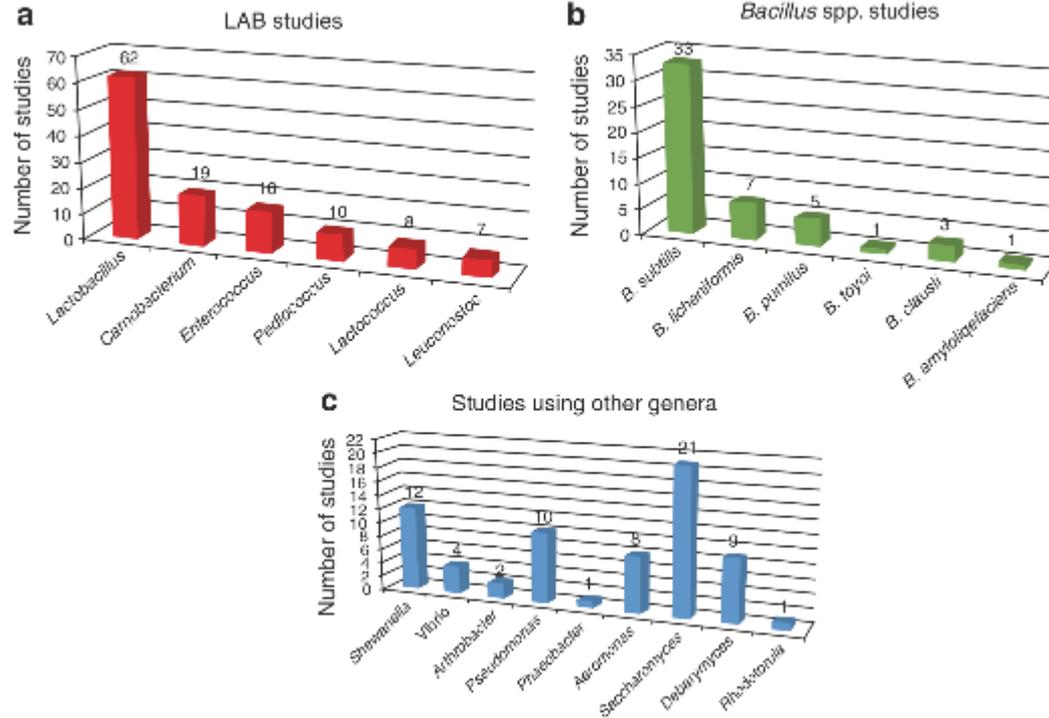
Scopus



Copyright © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved. Scopus® is a registered trademark of Elsevier B.V.

Fuente: Scopus (actualizado a 10/09/2018)

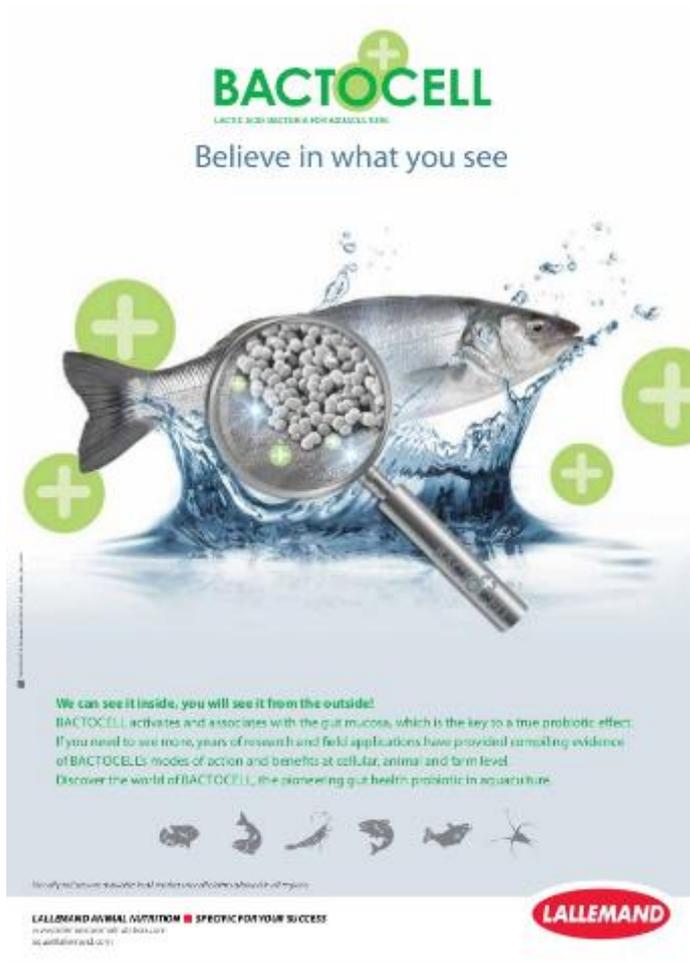
# Número de estudios *in vivo*



Abundancia de estudios científicos en peces distribuidos por especies de microorganismos probióticos investigados. A=BAL; b= *Bacillus* spp. Y c=otros géneros. (Rodiles *et al.* 2018)

- 200 estudios *in vivo* en 20 especies de peces:
- 122 estudios en BAL (*Lactobacillus* > 60 estudios)
- 50 estudios en *Bacillus* spp.
- 68 estudios en otros géneros (*Saccharomyces* > 20 estudios)

# Probióticos aprobados en UE



***Pediococcus acidilactici***  
de origen no acuático  
(pastos vegetales)

Administración en  
forma de pienso

- **Salmónidos y camarones:**
- Salmónidos mejora calidad del producto final: prevención del síndrome de la compresión vertebral (patente internacional IFREMER/INRA 2006)
- Camarones aumentando supervivencia y crecimiento y aumento resistencia frente a *Vibrio* spp.

# Retos en el uso de probióticos para acuicultura

- Ensayos en los que la administración del probiótico no ha dado lugar a **ningún resultado**
- Resultados son **poco reproducibles**. Posibles causas:
  - Diferencias en el régimen de alimentación
  - Diferencias en las dietas basales
  - Diferencias en el estado fisiológico del animal
  - Diferencias en las condiciones de cultivo
  - Interacciones probiótico-microbiota

**PRINCIPAL RETO:** buscar probióticos capaces de ejercer su acción en diferentes especies, condiciones de cultivo y etapas vitales

**PROBIÓTICO VERSÁTIL**

**CRITERIOS DE SELECCIÓN**

# Criteria de selección

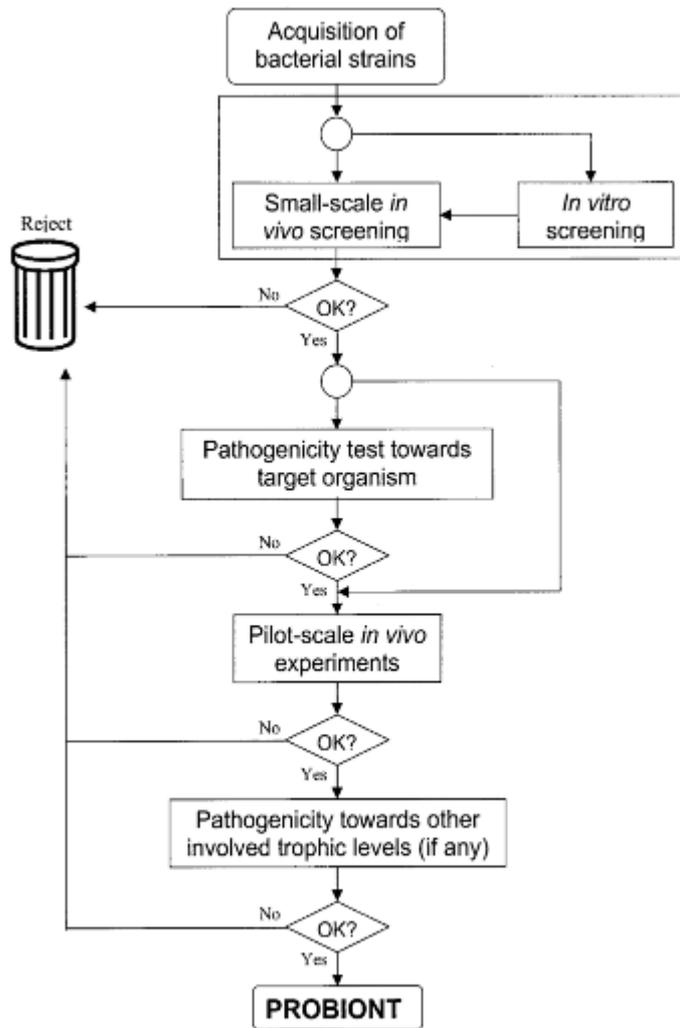
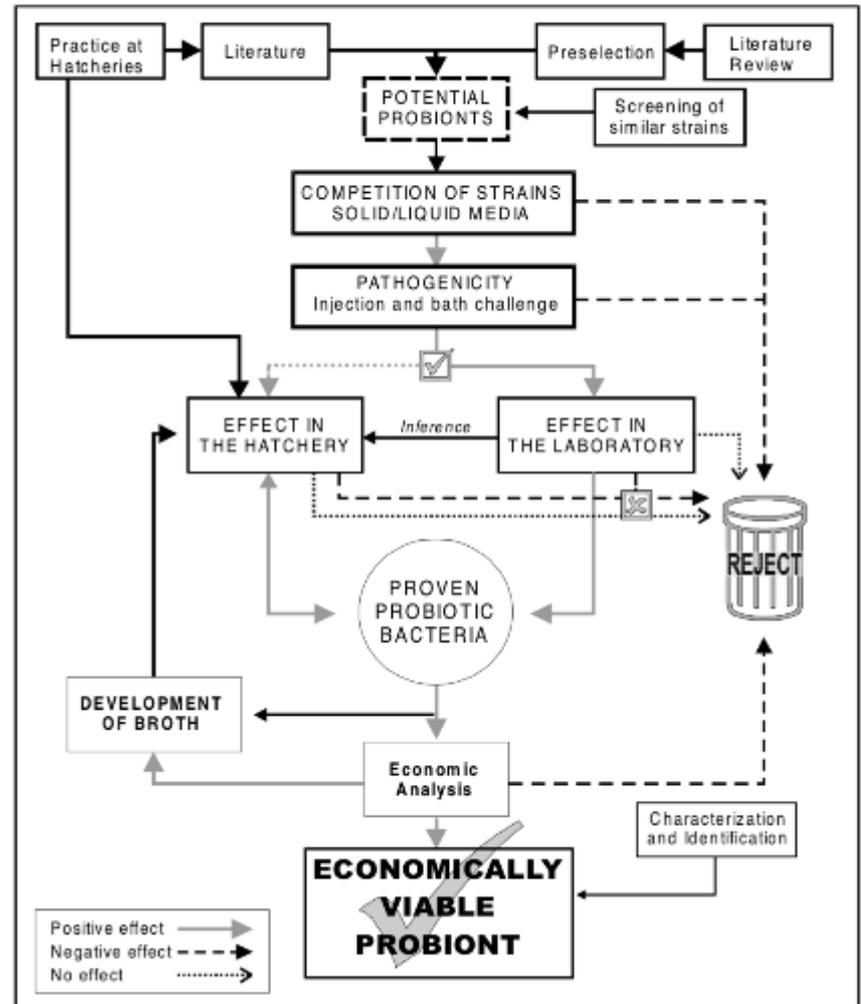


FIG. 1. Rationale for the research and development of probiotics as biological control agents in aquaculture.

(Verschuere *et al.*, 2000)

Figure 1. Flow diagram proposed to select probiotic microorganisms for use in the larval rearing of aquatic organisms.



(Gomez-Gil y Roque, 1998)

# Criteria de selección

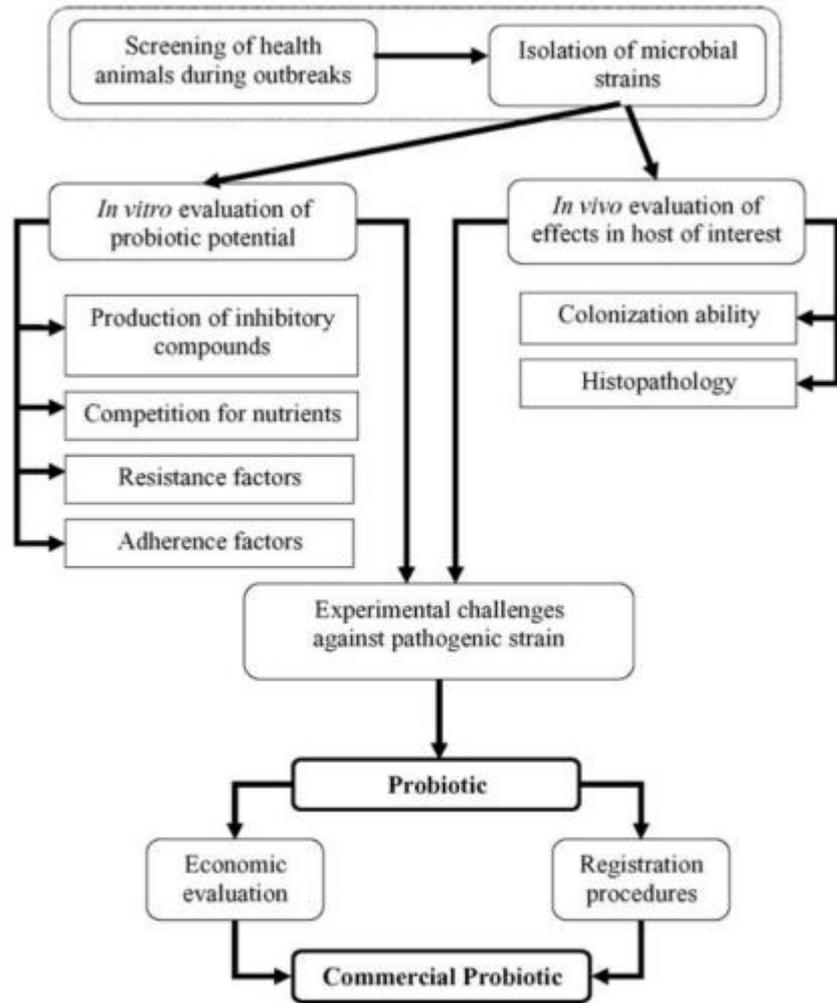
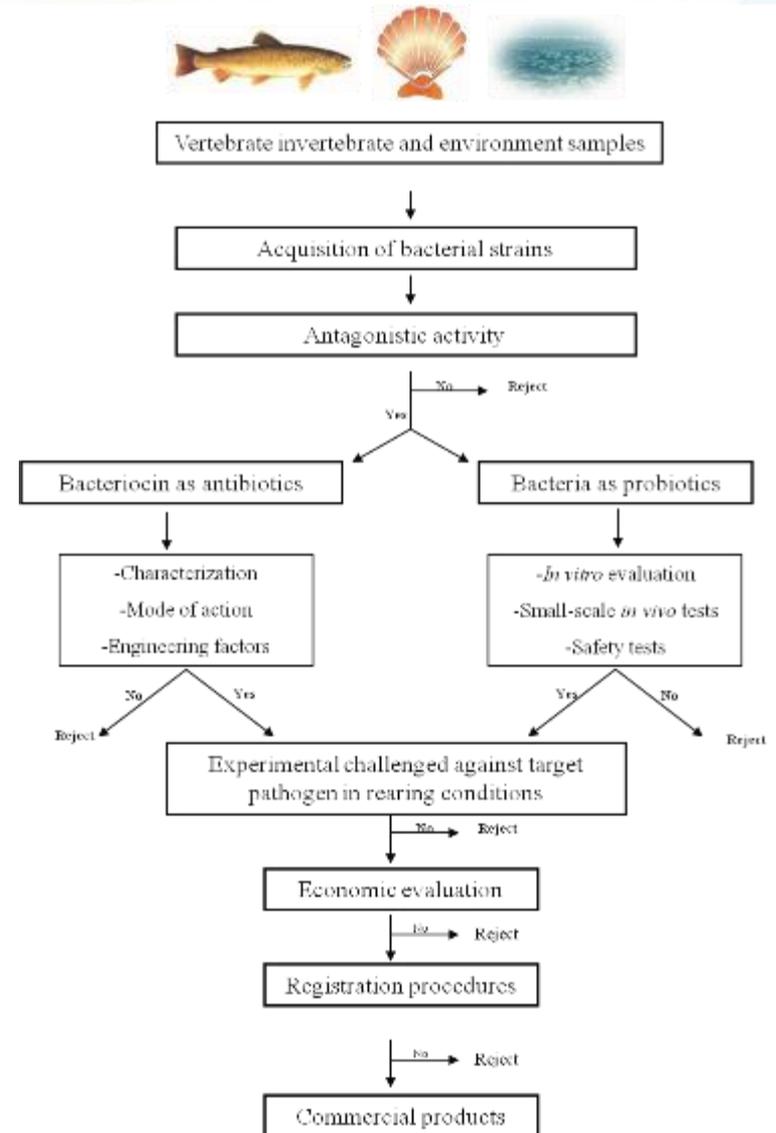


Fig. 1. Diagram for selection of probiotics as biocontrol agents in aquaculture.

(Balcázar et al., 2006)

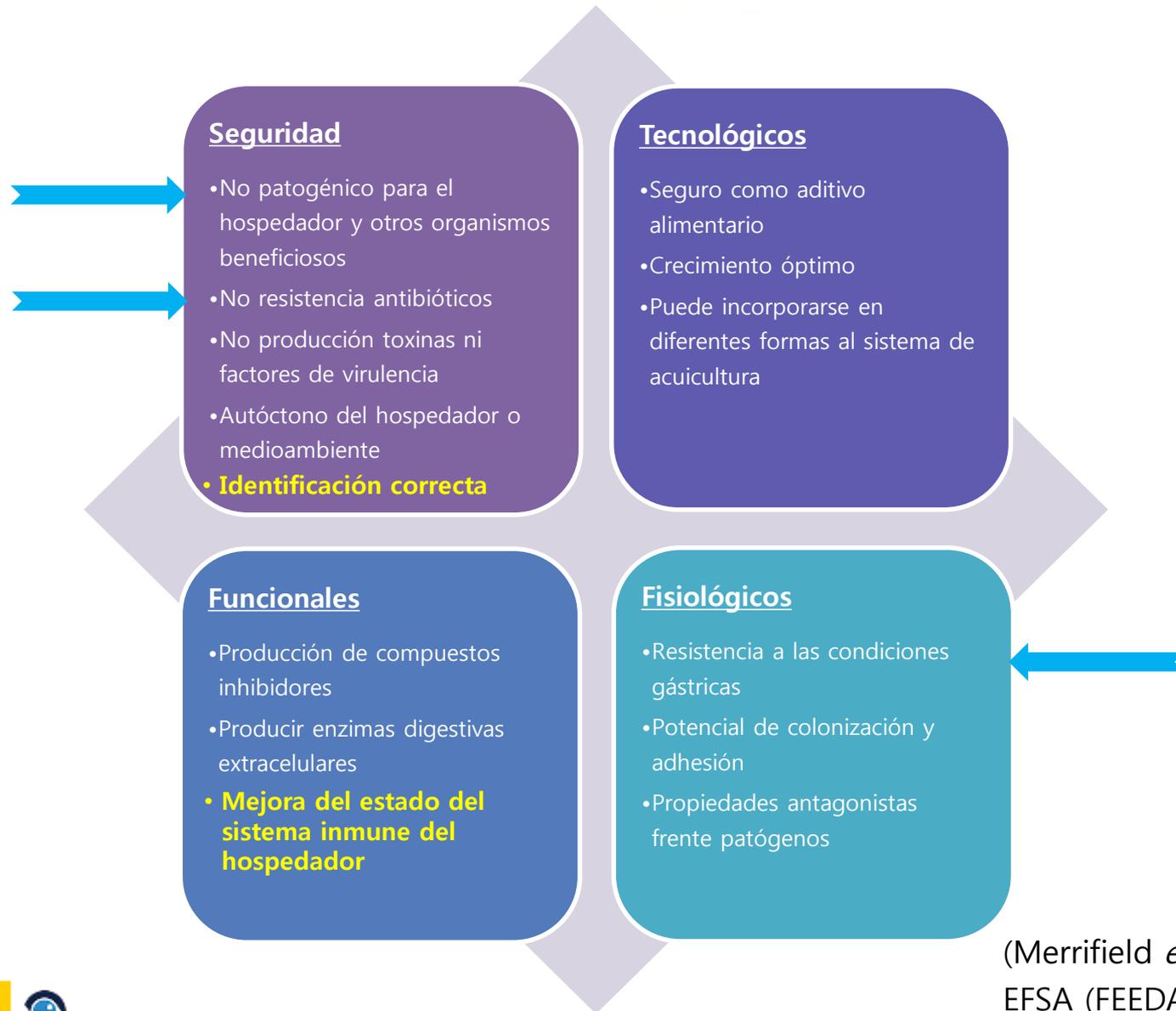


(Desriac et al., 2010)

# Criterios de selección



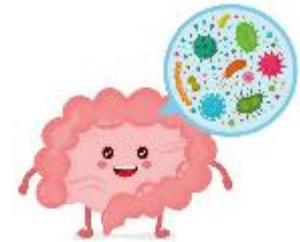
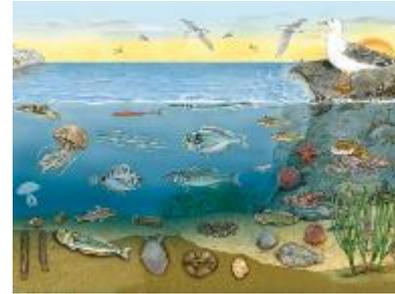
# CRITERIOS DE SELECCIÓN: recopilación de información disponible



(Merrifield *et al.*, 2010)  
EFSA (FEEDAP)

# Criterios de selección: Aislamiento de microorganismos

- **Fuentes de microorganismos:**
  - MEDIOAMBIENTE MARINO
  - MISMA ESPECIE ANIMAL
  - OTRO ORIGEN



- **Condiciones de cultivo:**
  - MEDIOS DE CULTIVO
  - TEMPERATURA
  - ETC ...



# Crterios de seleccin: Aislamiento de microorganismos



TSA + 1,5% NaCl



**198 colonias**



1 – 7 das 25-30°C aerobiosis



MRS + 1,5% NaCl



**242 colonias**

# Criterios de selección: Ensayos *in vitro*

**Antagonismo  
frente a  
patógenos**

**Resistencia al  
paso por el TGI**

**Aspectos  
tecnológicos**

**Crecimiento y  
adhesión al  
mucus**

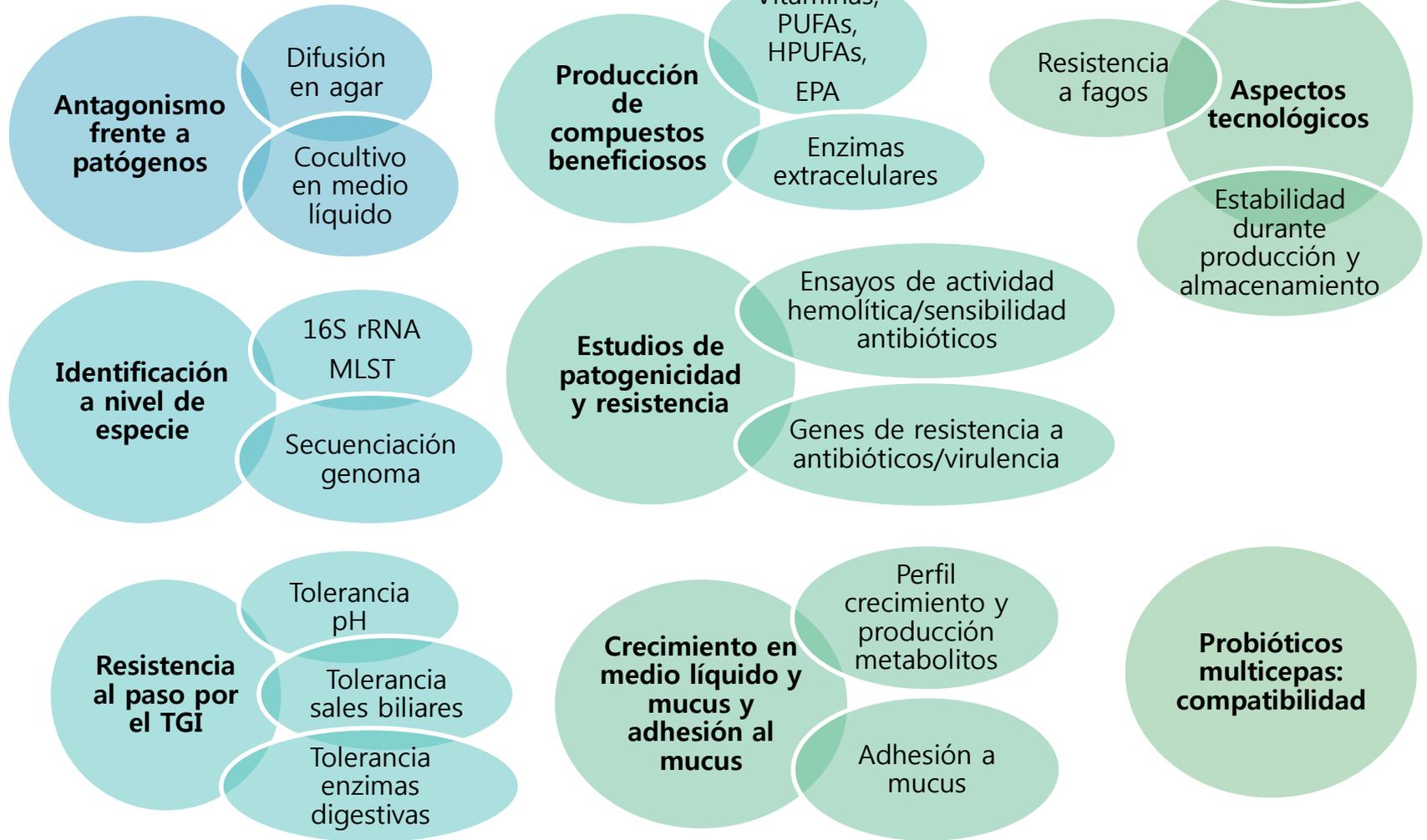
**Estudios de  
patogenicidad y  
resistencia**

**Probióticos  
multicepas:  
compatibilidad**

**Producción de  
compuestos  
beneficiosos**

**Identificación a  
nivel de especie**

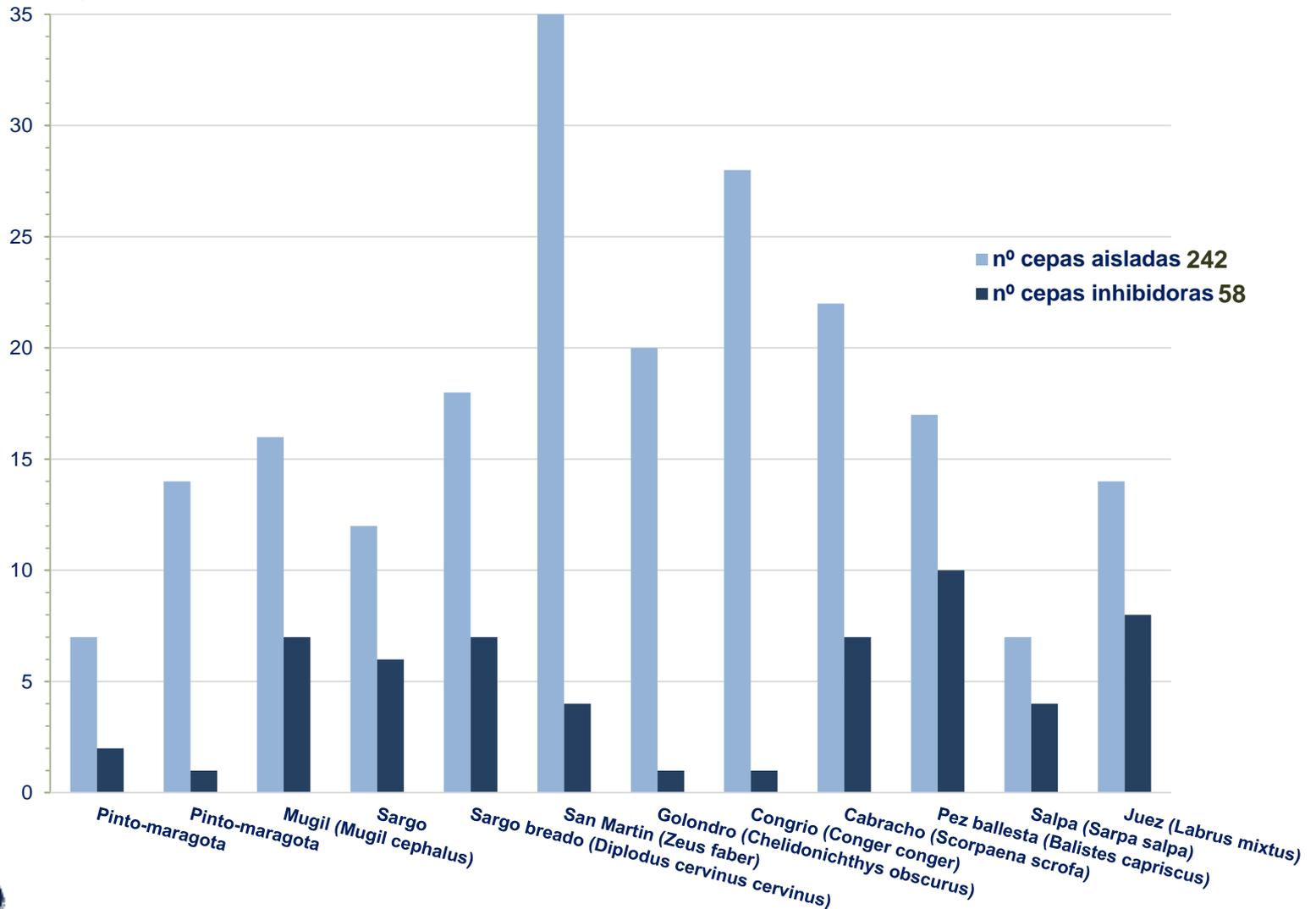
# Criterios de selección: Ensayos *in vitro*





# Isolation and Partial Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Gut Microbiota of Marine Fishes for Potential Application as Probiotics in Aquaculture

Sergio Alonso<sup>1</sup> · M. Carmen Castro<sup>1</sup> · Margarita Berdasco<sup>1</sup> · Inés García de la Banda<sup>2</sup> · Xabier Moreno-Ventas<sup>1</sup> · Alma Hernández de Rojas<sup>1</sup>

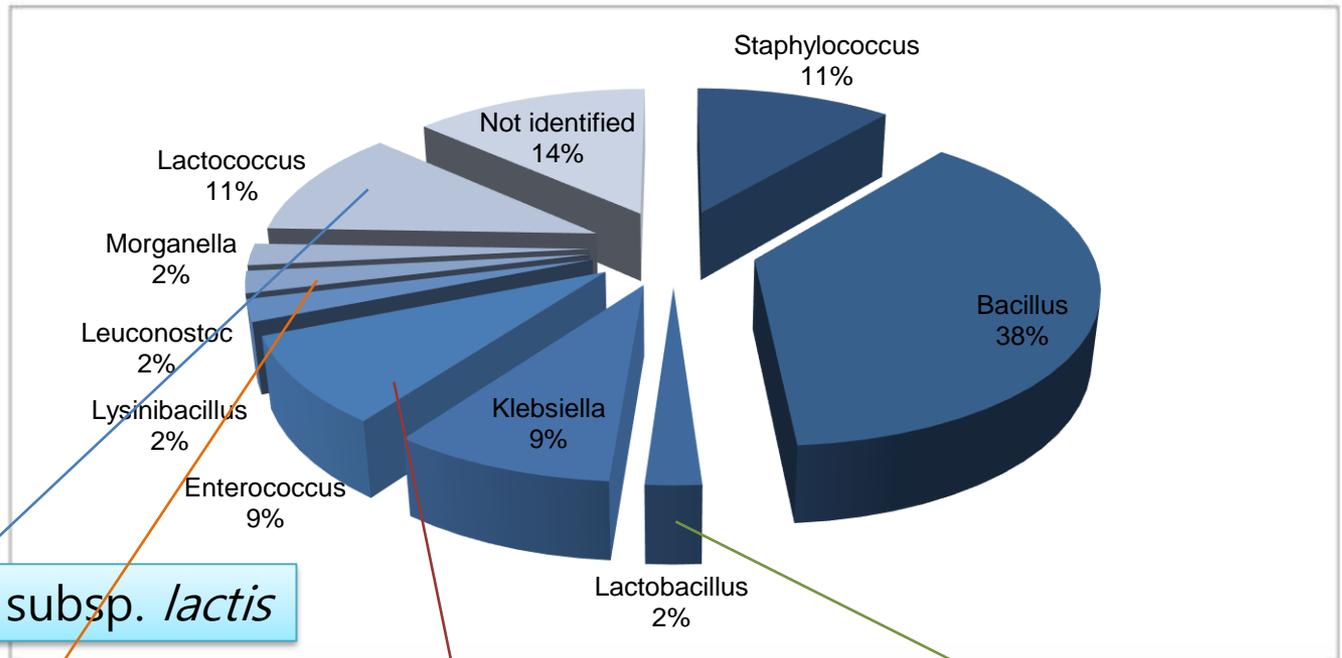




## Isolation and Partial Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Gut Microbiota of Marine Fishes for Potential Application as Probiotics in Aquaculture

Sergio Alonso<sup>1</sup> · M. Carmen Castro<sup>1</sup> · Margarita Berdasco<sup>1</sup> · Inés García de la Banda<sup>2</sup> · Xabier Moreno-Ventas<sup>1</sup> · Alma Hernández de Rojas<sup>1</sup>

**Fig. 3** Taxonomic groups of strains with antimicrobial potential identified by partial 16S rRNA gene sequencing



*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

*Leuconostoc mesenteroides*

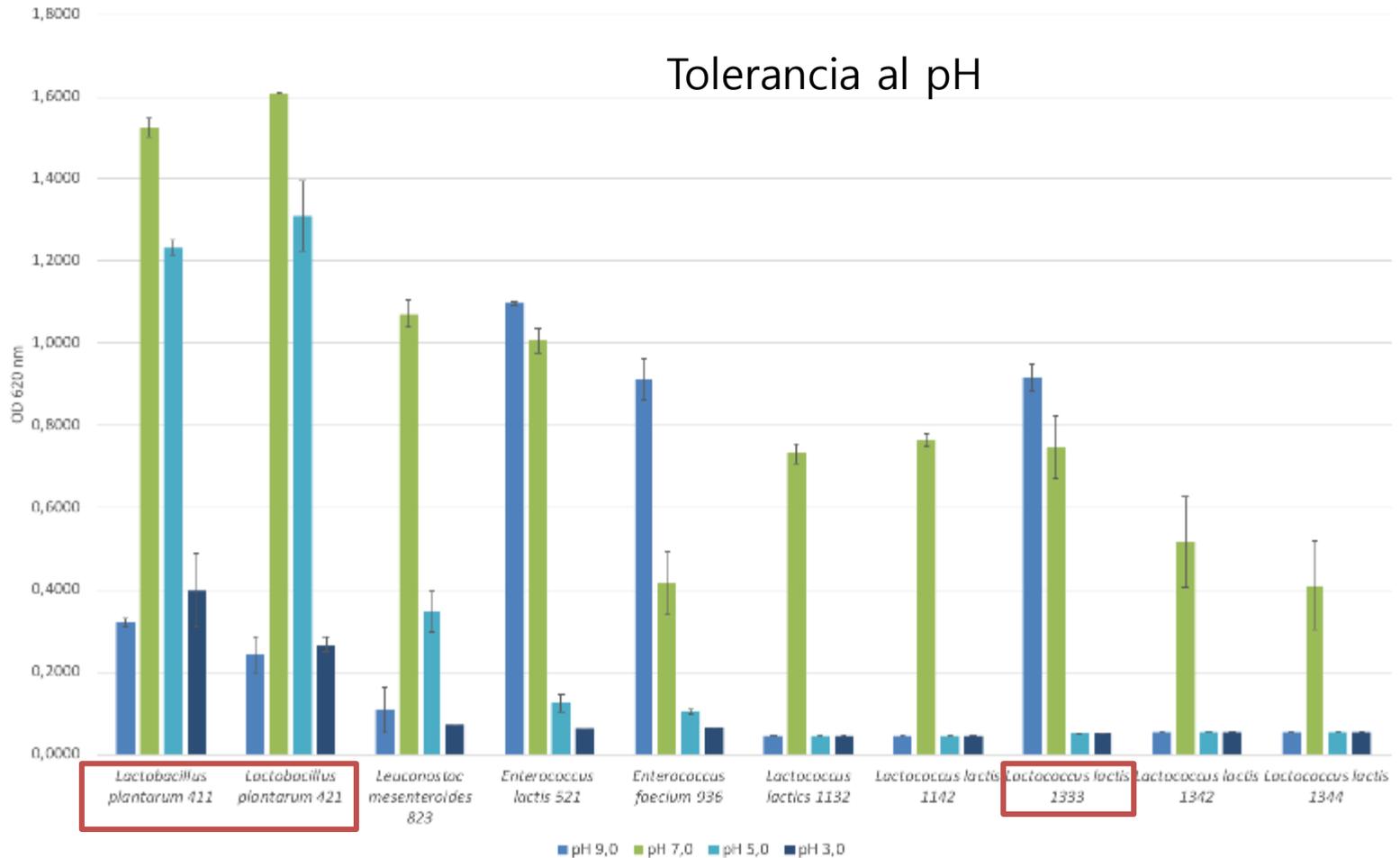
*Enterococcus faecium*

*Lactobacillus plantarum*



# Isolation and Partial Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Gut Microbiota of Marine Fishes for Potential Application as Probiotics in Aquaculture

Sergio Alonso<sup>1</sup> · M. Carmen Castro<sup>1</sup> · Margarita Berdasco<sup>1</sup> · Inés García de la Banda<sup>2</sup> · Xabier Moreno-Ventas<sup>3</sup> · Alma Hernández de Rojas<sup>1</sup>

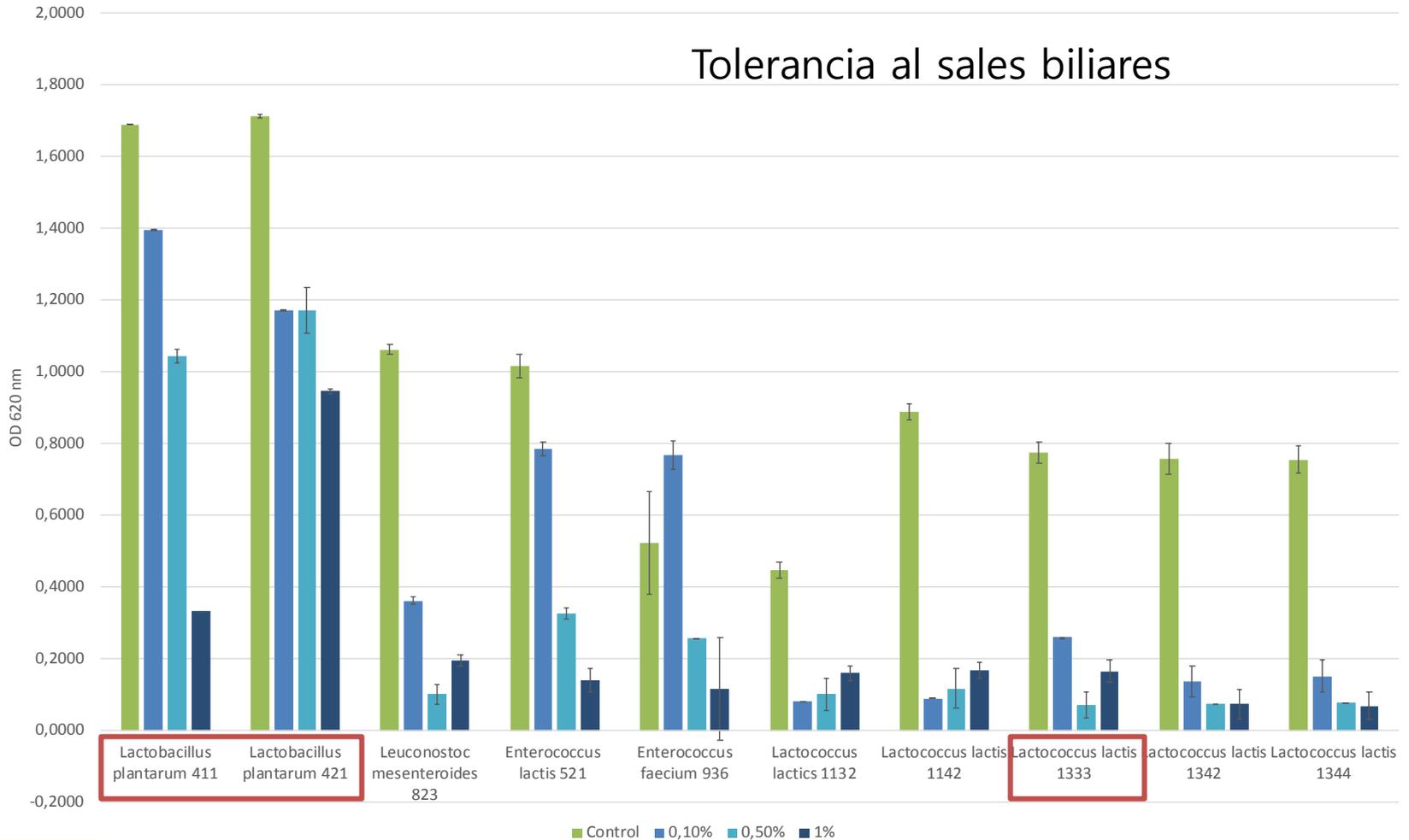




# Isolation and Partial Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Gut Microbiota of Marine Fishes for Potential Application as Probiotics in Aquaculture

Sergio Alonso<sup>1</sup> · M. Carmen Castro<sup>1</sup> · Margarita Berdasco<sup>1</sup> · Inés García de la Banda<sup>2</sup> · Xabier Moreno-Ventas<sup>1</sup> · Alma Hernández de Rojas<sup>1</sup>

## Tolerancia al sales biliares

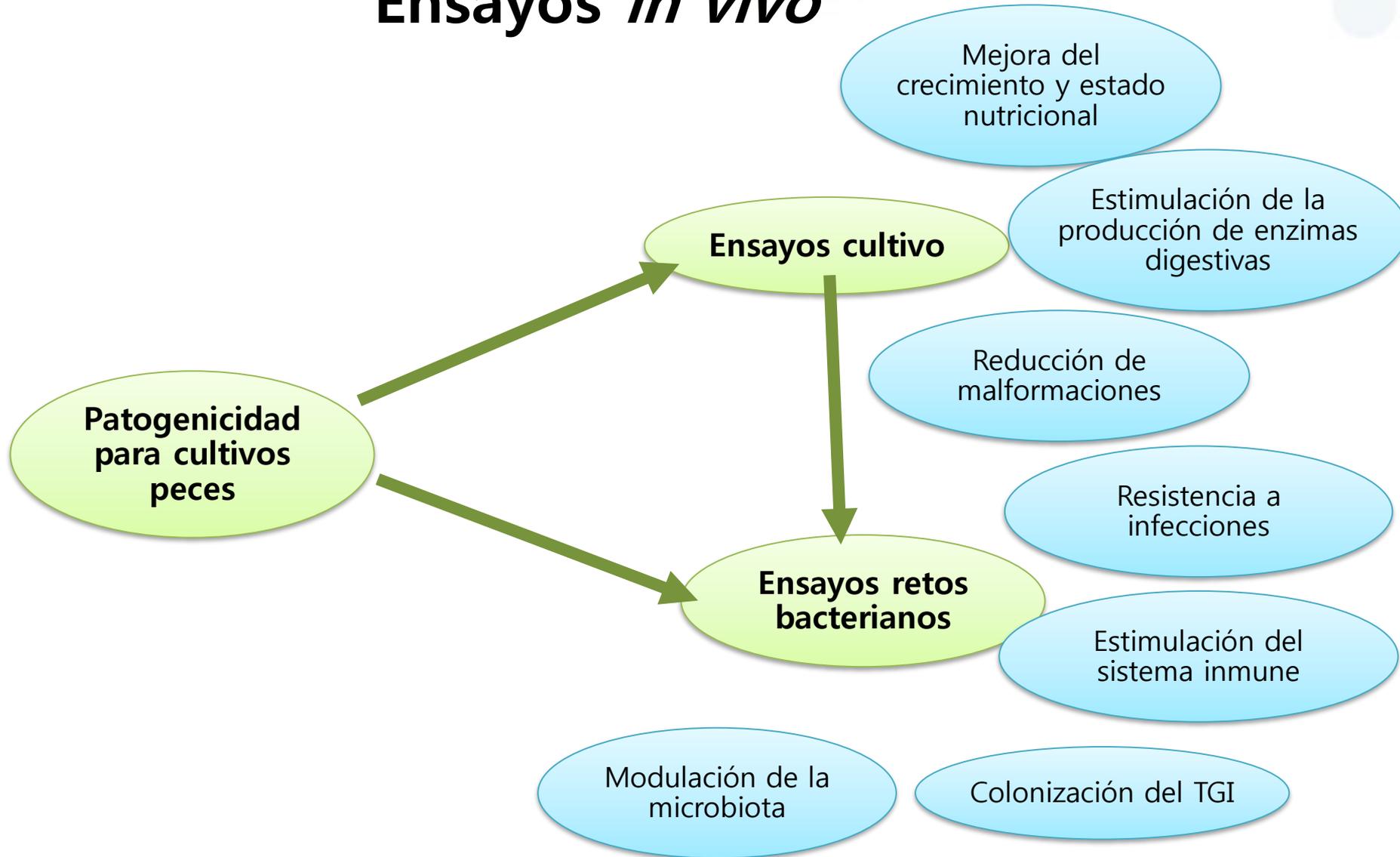


# Criterios de selección: Ensayos *in vivo*

Patogenicidad  
para cultivos  
auxiliares



# Criterios de selección: Ensayos *in vivo*



# Criterios de selección: Estudio económico de viabilidad y Autorización y comercialización



# Retos en el uso de probióticos para acuicultura

**PRINCIPAL RETO:** buscar probióticos capaces de ejercer su acción en diferentes especies, condiciones de cultivo y etapas vitales

**PROBIÓTICO VERSÁTIL**

**CRITERIOS DE SELECCIÓN**

**CRITERIOS DE ADMINISTRACIÓN**

# CRITERIOS DE ADMINISTRACIÓN

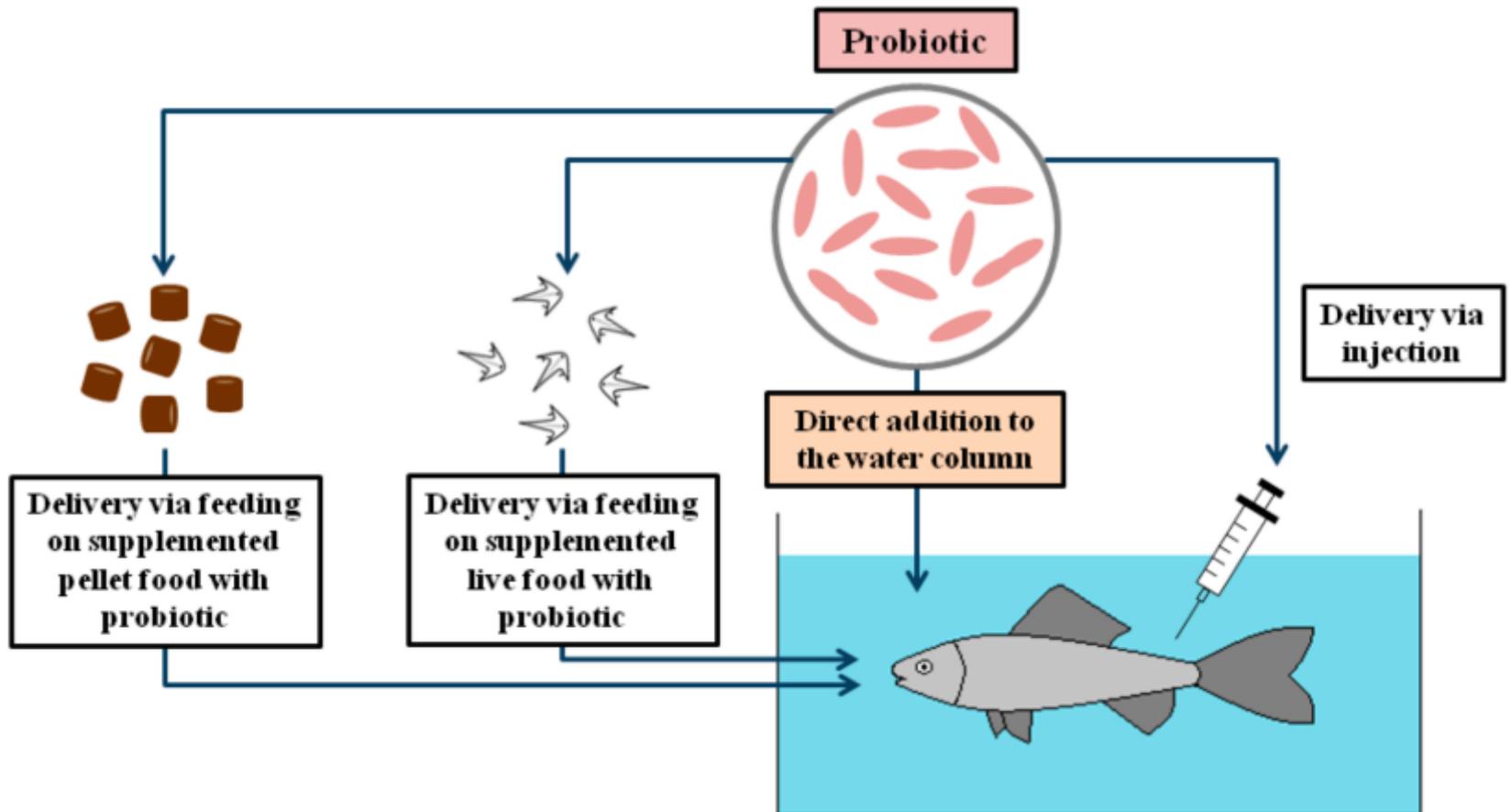
¿Dónde y Cómo?

```
graph TD; A[¿Dónde y Cómo?] --> B[¿Cuándo?]; B --> C[¿Cuánto?];
```

¿Cuándo?

¿Cuánto?

# Crterios de administracin: ¿dnde y cmo?



(Jahangiri and Esteban, 2018)

# Criterios de administración: ¿dónde y cómo?

## ALGAS UNICELULARES:

- ✓ Aumentan el rendimiento de la producción de algas.

## BIOENCAPSULADOS: ROTÍFEROS Y ARTEMIA:

- ✓ Contribuyen nutricionalmente
- ✓ Eliminan carga microbiana de *Vibrio* spp.

## ALIMENTO SECO:

- ✓ Con aglutinante (alginato o aceite)
- ✓ Encapsulados

## TIPO DE FORMULACIÓN:

- **Secos**
- **Líquidos**

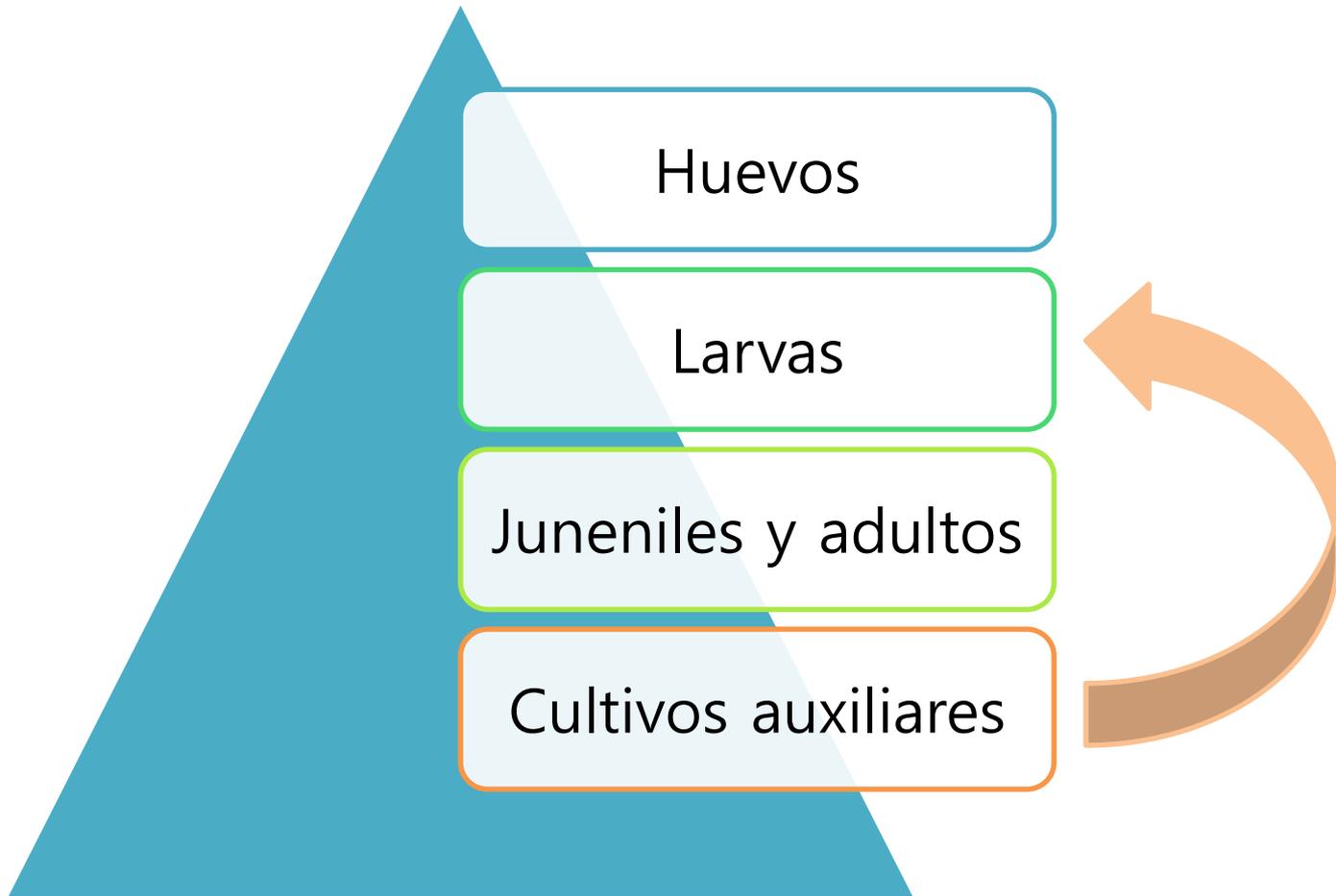
## ESTADO DEL PROBIÓTICO:

- **Vivo**
- **Inerte**

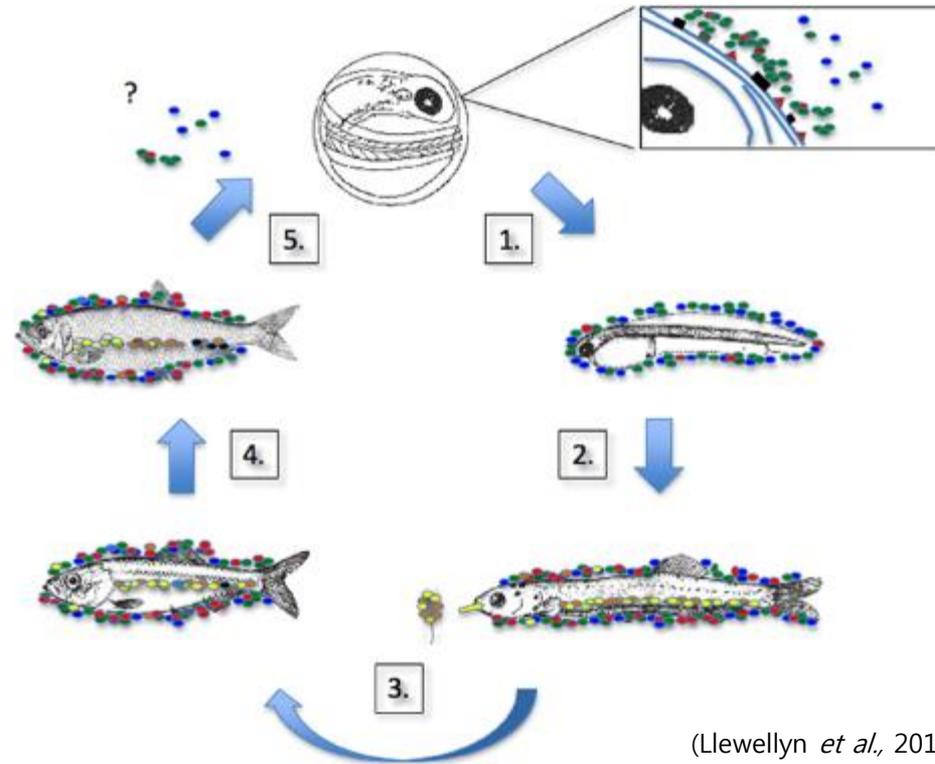
## CANTIDAD DE CEPAS/MICROORGANISMOS:

- **Monocepa**
- **Multicepas/multiorganismos**

# Criterios de administración: ¿cuándo?



# Criterios de administración: ¿cuándo?

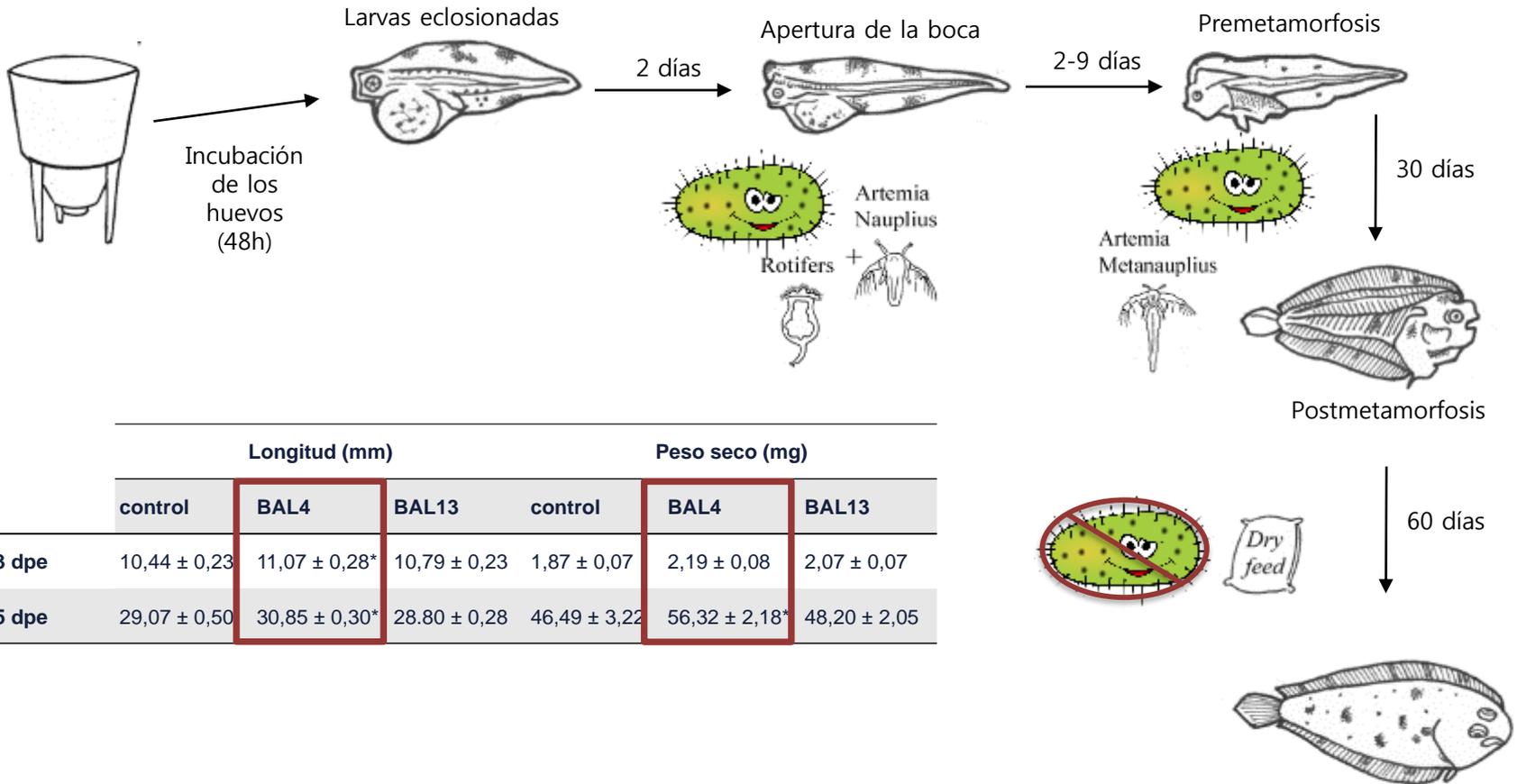


Administración temprana:

- El sistema inmune no está desarrollado
- Se evita/reduce la proliferación de microorganismos oportunistas (que están presentes sobre todo en el alimento vivo)

# Aplicación *in vivo* de las BAL en larvas de *Solea senegalensis*

## Cultivo larvario



	Longitud (mm)			Peso seco (mg)		
	control	BAL4	BAL13	control	BAL4	BAL13
23 dpe	10,44 ± 0,23	11,07 ± 0,28*	10,79 ± 0,23	1,87 ± 0,07	2,19 ± 0,08	2,07 ± 0,07
55 dpe	29,07 ± 0,50	30,85 ± 0,30*	28,80 ± 0,28	46,49 ± 3,22	56,32 ± 2,18*	48,20 ± 2,05

# Criterios de administración: ¿cuánto?

La **dosis y frecuencia** depende de diversos **factores**:

- Especie/cepa de microorganismo probiótico
- Especie del hospedador
- Estado fisiológico del hospedador
- Condiciones del cultivo
- Objeto de aplicación de la cepa:
  - ✓ Mantenimiento del buen estado de salud
  - ✓ Resistencia a enfermedades
  - ✓ Mejora del estado nutricional

La relación dosis/efecto debe ser determinada cuidadosamente para evitar:

- **SOBREDOSIS**: que da lugar a un menor efecto y aumento del coste
- **INFRADOSIS**: que reduce la eficacia del probiótico

# EN RESUMEN

## CRITERIOS DE SELECCIÓN

Recolección de información

## CRITERIOS DE ADMINISTRACIÓN

Necesariamente hay que estudiar:

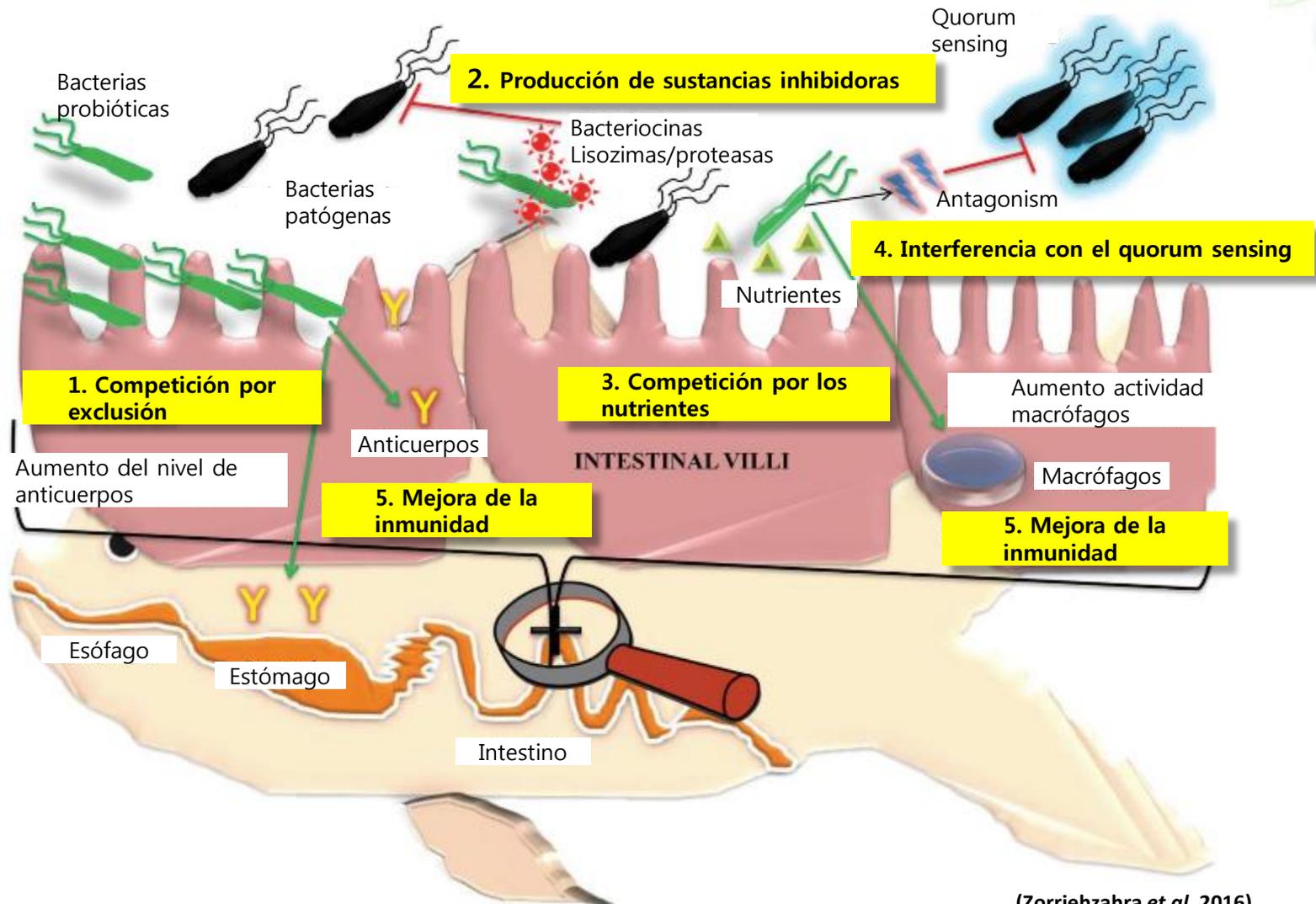
- **MODO DE ACCIÓN DE LOS PROBIOTICOS**
- **MICROBIOMA DE LOS HOSPEDADORES**

Estudio económico de viabilidad

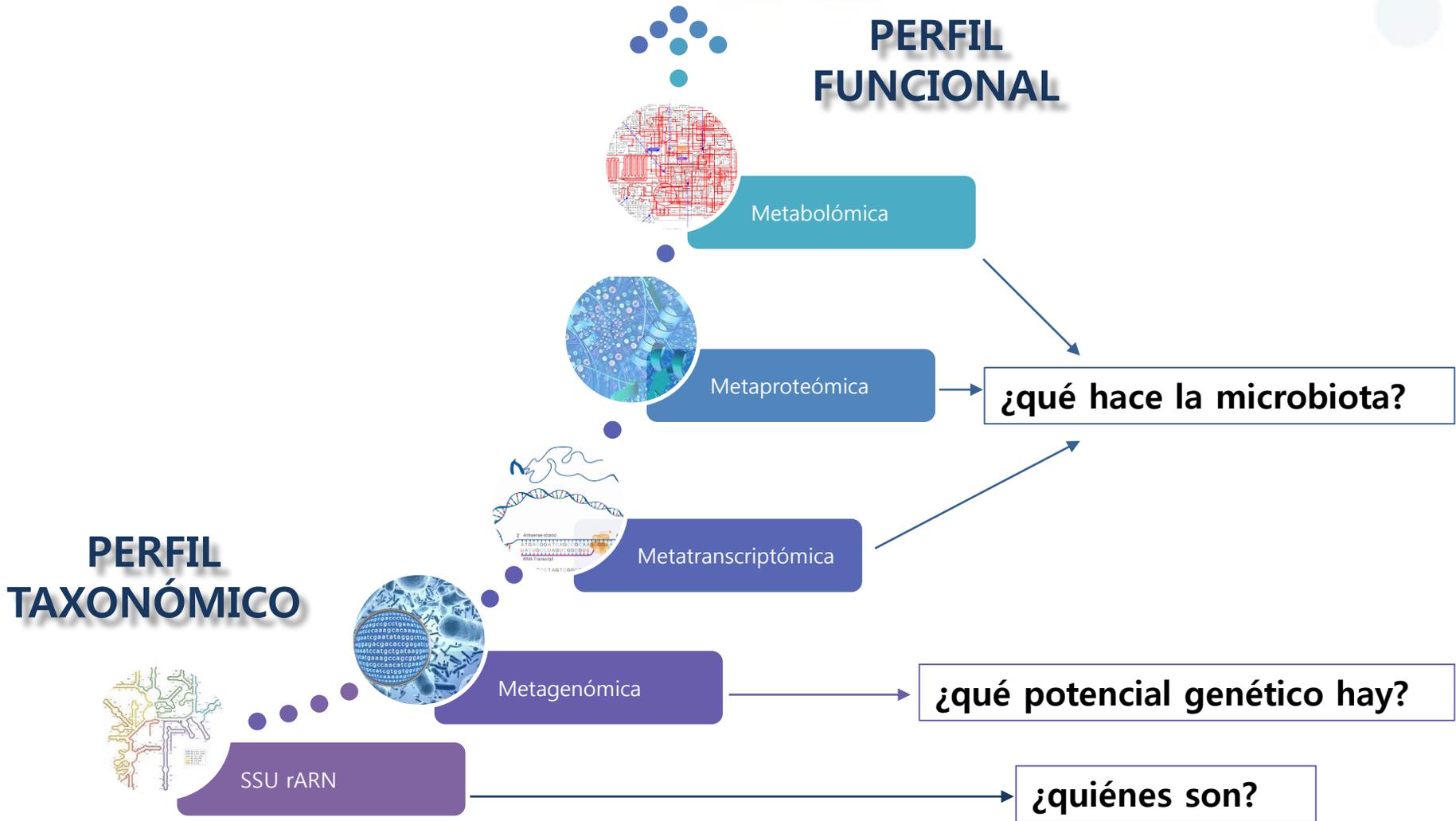
Aprobación y comercialización

¿Cuánto?

# Estudio del modo de acción



# Estudio de la microbiota



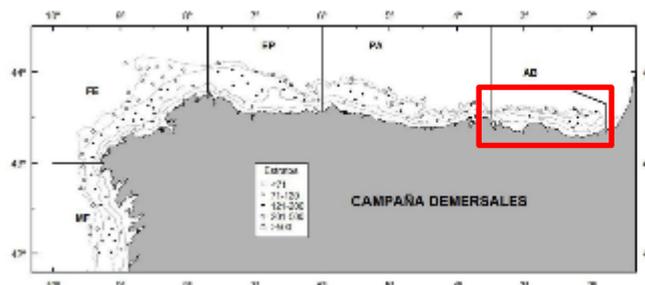


# ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE *Solea solea* SALVAJE

María del Mar Gómez García

24 de julio de 2018

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales  
Trabajo Fin de Máster

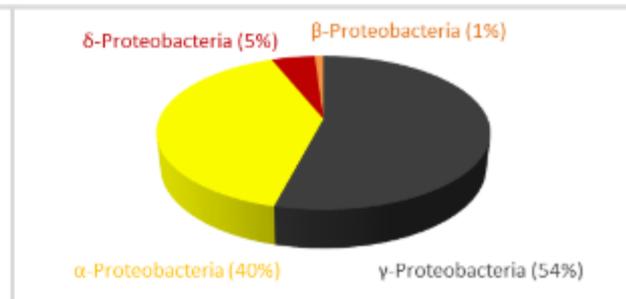
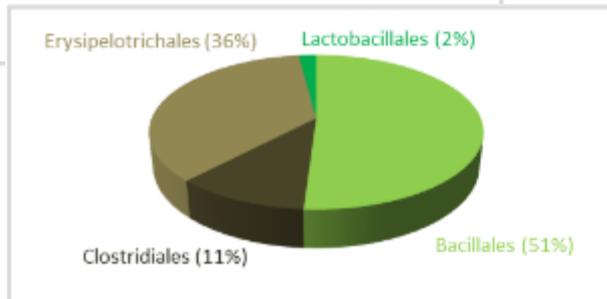
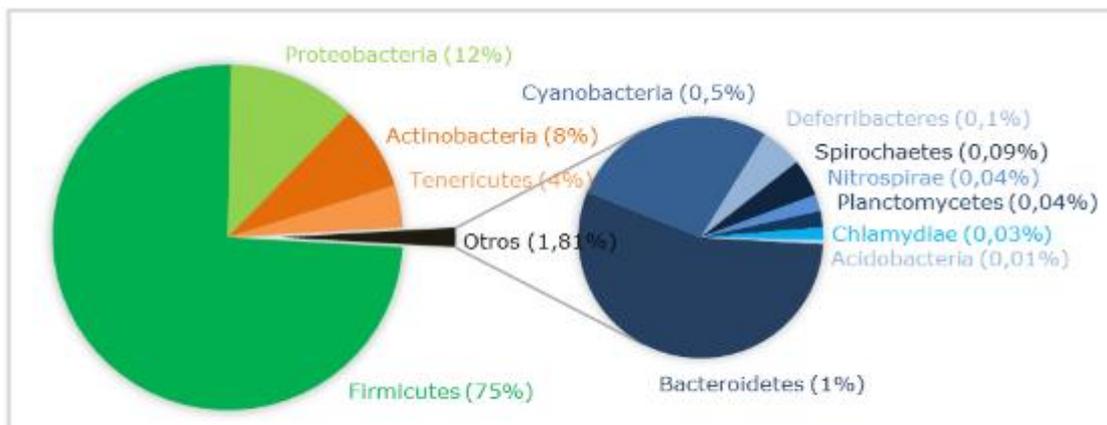


## CO DEMERSALES 2017

- B/O Miguel Oliver
- 04/10/2017 – 23/10/2017
- Estaca de Bares - Bidasoa
- 70-100 m de profundidad



## ABUNDANCIA RELATIVA DE LOS GRUPOS TAXONOMICOS IDENTIFICADOS



**Gracias por su atención**

