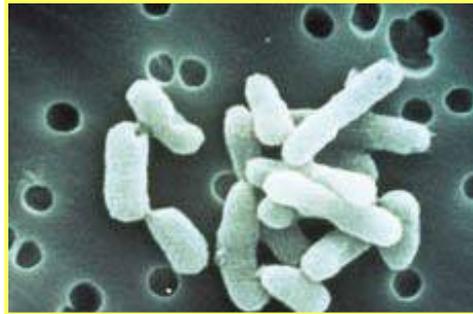


Interreg
España - Portugal



Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolupament Regional

CVMAR+i
Industrial Innovation and
Marine Biotechnology Valorisation



Probióticos y Nutracéticos de Origen Marino aplicados a la Acuicultura. Estado del Arte

Bioencapsulación Probiótica en Alimento Vivo para Larvicultura

Inés García de la Banda



Planta de Cultivos Santander
Centro Costero Gijón

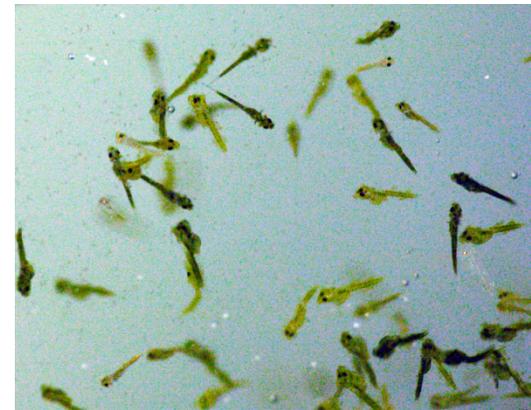


Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

Bioencapsulación Probiótica en Alimento Vivo para Larvicultura

INDICE

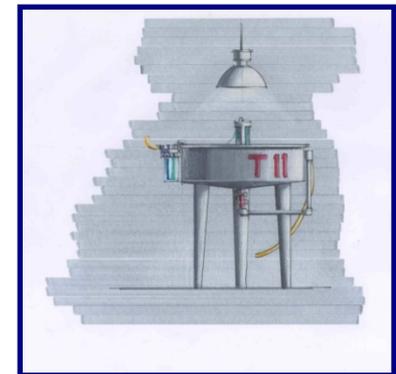
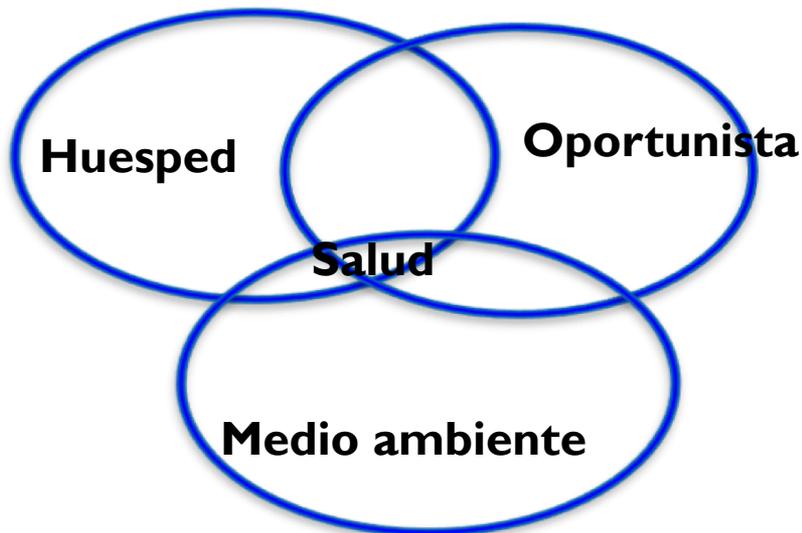
- Interés y efectos de la aplicación probiótica en larvicultura.
- Administración probiótica. Bioencapsulación en alimento vivo. Selección de cepas, producción probiótica y ensayos previos.
- Protocolo de Bioencapsulación. Optimización de los pulsos probióticos.
- Resultados de la aplicación probiótica:
 - * en el alimento vivo
 - * en el cultivo larvario y destete



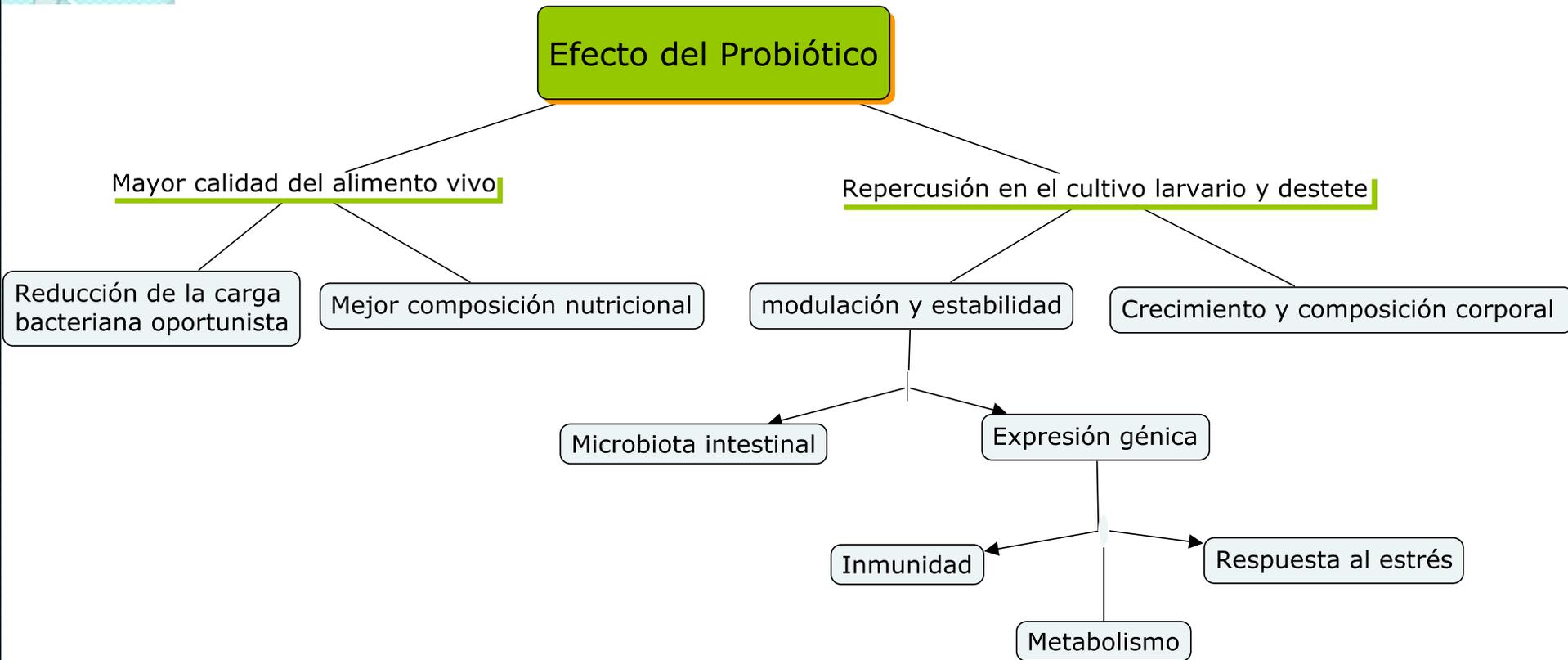
Interés de la Aplicación Probiótica en Larvicultura

- Reside en la primera relación simbiótica microorganismo-hospedador, que apoya:

- a) el menor desarrollo inmune en esta etapa
- b) las específicas necesidades nutritivas de los ejemplares
- c) el enfrentamiento a las condiciones de cultivo intensivo

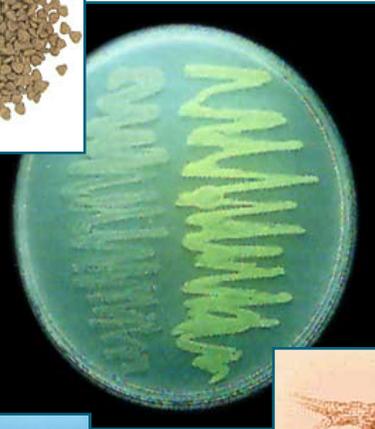


Efecto de la Aplicación Probiótica en Larvicultura



Aplicación Probiótica en el Cultivo Larvario de Peces Marinos

en el microencapsulado



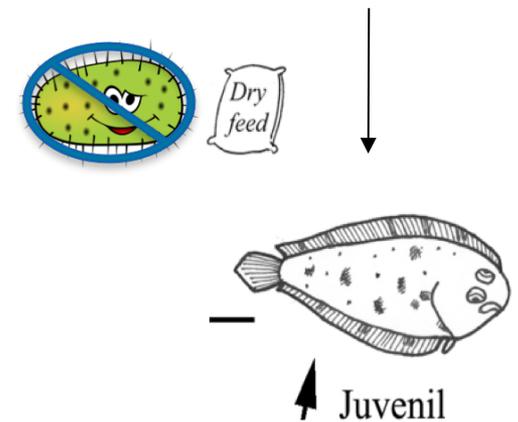
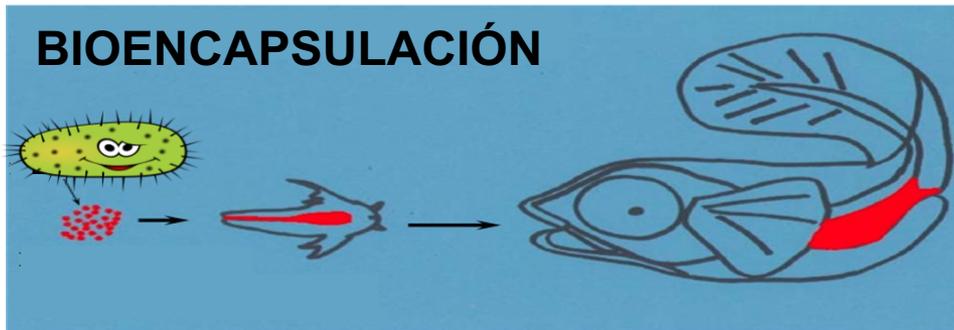
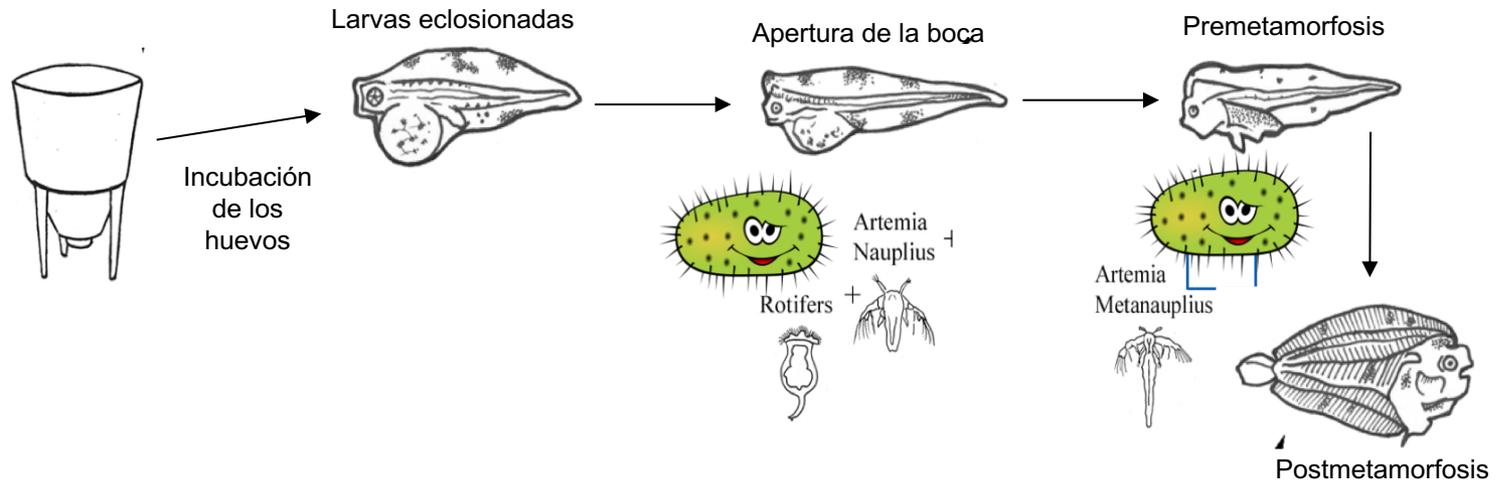
directamente en
agua del tanque



bioencapsulado (vivo, liofilizado o inactivado) en alimento vivo
(Rotífero o *Artemia*) *

* Se precisarán ensayos previos de cocultivo de los probióticos con el fitoplancton (*Chlorella* e *Isochrysis*) y zooplancton (rotífero y *Artemia*) utilizados en el cultivo larvario

Bioencapsulación Probiótica en Cultivo Larvario de Peces

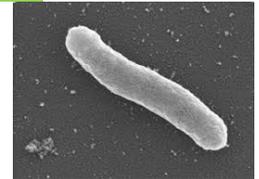


Origen de las cepas probióticas ensayadas



Shewanella Pdp11

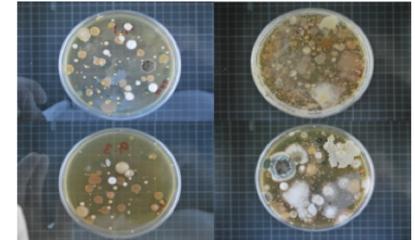
aislada de piel de dorada sana cultivada



***Lactobacillus BAL4* y *Lactococcus BAL 13*,**
aisladas de intestino de peces del medio marino

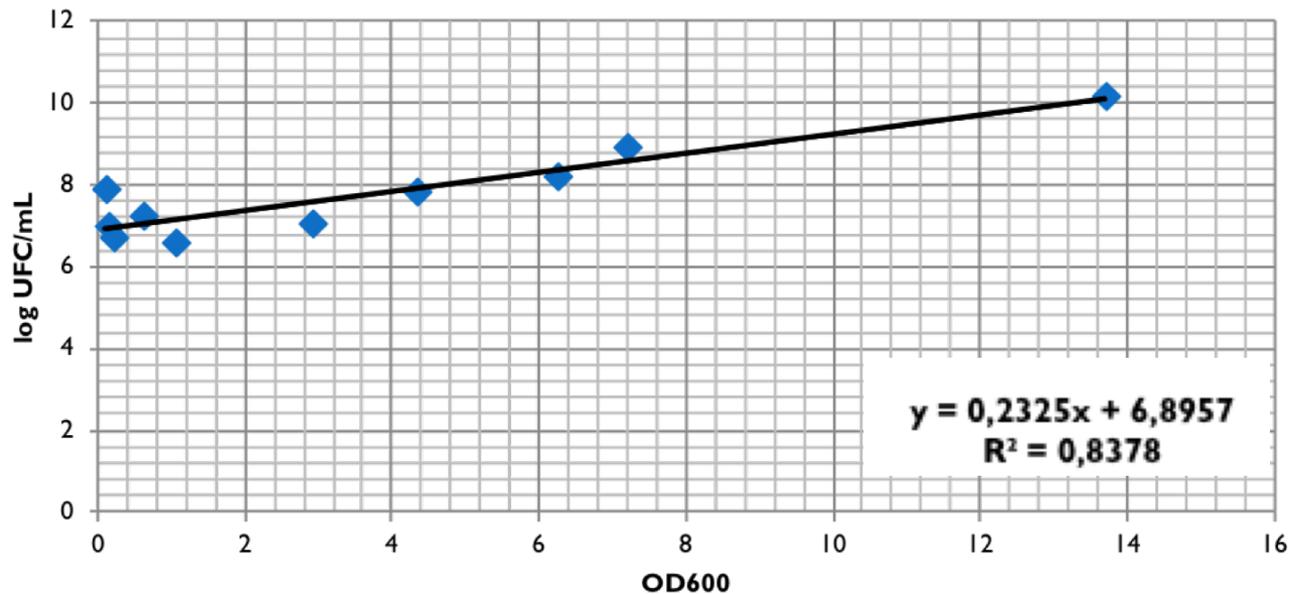
Seleccionadas por su potencial probiótico in vitro:

- Ausencia de patogenicidad
- Antagonismo frente a patógenos de peces habituales
- Tolerancia frente a las condiciones intestinales (pH, sales biliares)
- Adhesión y crecimiento en mucus intestinal



Producción probiótica en el laboratorio

- Cultivo en un medio nutritivo apropiado:
 - * TSAs en placa para *Shewanella* Pdp11
 - * MRSs en tubo para *Lactobacillus* BAL4 y *Lactococcus* BAL13
- Incubación en estufa (25/30°C)



- Determinación del crecimiento diario (espectrofotometría).

Ensayos previos para una bioencapsulación adecuada en alimento vivo

Una vez conocida la capacidad diaria de producción probiótica se realizan ensayos para comprobar:

* **inocuidad**

* **nivel de bioencapsulación**

a diferentes dosis probióticas

a diferentes densidades de alimento vivo

* **tiempos de bioencapsulación**

* **Concentración probiotica** y carga bacteriana total en rotífero y *Artemia*

Protocolo de Bioencapsulación en Alimento Vivo



- | | Rotífero | Artemia |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| • Condiciones | | |
| • <u>Agua mar:</u> | Salobre, desinfectada (20°C) | Filtrada l u (25°C) |
| • <u>Concentración:</u> | 200 ind/ml | 200 ind/ml |
| • | | |
| • <u>Dosis probiótica:</u> | 2.5-4.5 x 10 ⁷ ufc/ml | 2.5-4.5 x 10 ⁷ ufc/ml |
| • <u>Tiempo:</u> | 3-6 h | 3-9 h |
| • <u>Nivel bioencapsulación:</u> | 4-9 x 10 ² ufc/ ind | 4-9 x 10 ² ufc/ ind |

Protocolo de Administración del Alimento Vivo tras Bioencapsulación Probiótica

Filtrado

Lavado

Seleccionar

Momento de administración probiótica

Duración del pulso probiótico

Rotifero

Artemia

2-20 dpe

10-30 dpe

Administración al tanque de cultivo larvario



Rotifero

Artemia + Microencapsulado



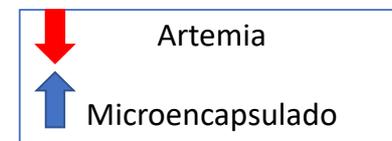
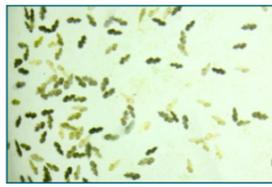
2 dph

10 dph

20 dph

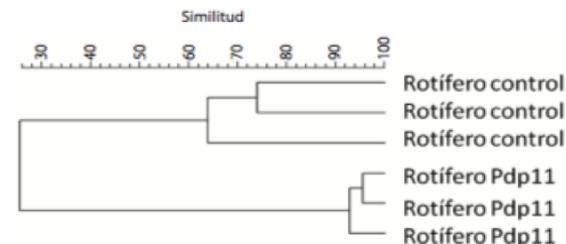
45 dph

65 dph

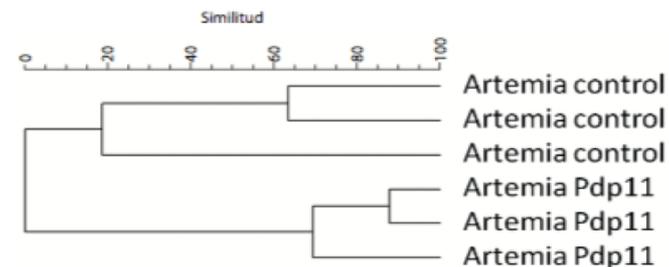


Resultados de Bioencapsulación de *Shewanella* Pdp11 en rotífero y *Artemia*

- a) *modifica el microbioma.
 *incrementa la similitud de la biota en alimento vivo
 *reduce la presencia de *Vibrionaceae* diferentes a *Shewanella*.



- b) presenta mayor calidad nutritiva:
 - nivel de proteínas y lípidos
 - mejor perfil de ácidos grasos

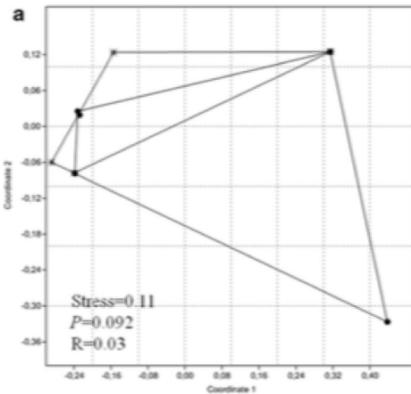


Composición corporal	Artemia control	Artemia Pdp I I
Proteínas (mg/g)	36,43	40,50
Lípidos (mg/g)	17,30	20,47*
DHA (%)	7,18	11,43*
EPA (%)	3,94	5,76*
n-3-HUFAs (%)	12,57	18,61*

Resultados de Bioencapsulación de *Shewanella* Pdp I I en Cultivo Larvario de Lenguado Senegalés

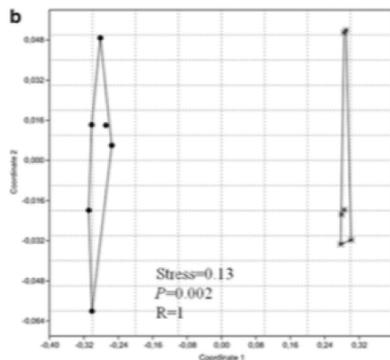
En la Microbiota:

- * Colonización probiótica del intestino y permanencia hasta 2 meses después de su administración.
- * Modulación y estabilización de la microbiota intestinal:

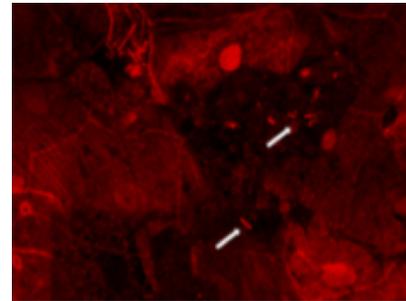


a) reducción de patógenos y oportunistas (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Vibrio* sp)

b) incremento de especies beneficiosas como *Lactobacillus helveticus*.



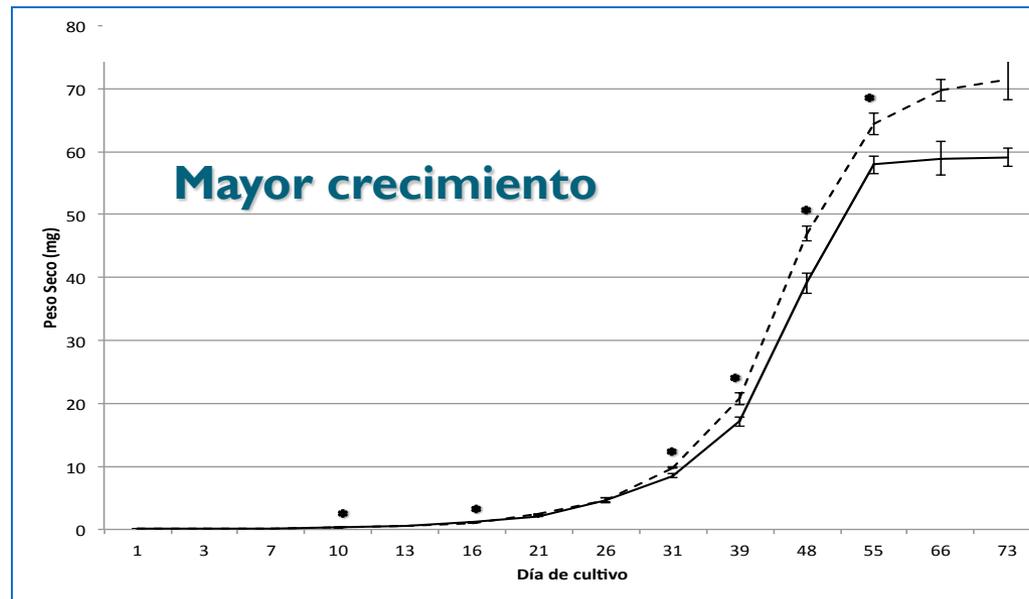
c) aumento de la diversidad de especies microbianas.



Resultados de Bioencapsulación de *Shewanella* Pdp11 en Cultivo Larvario de Lengüado Senegalés

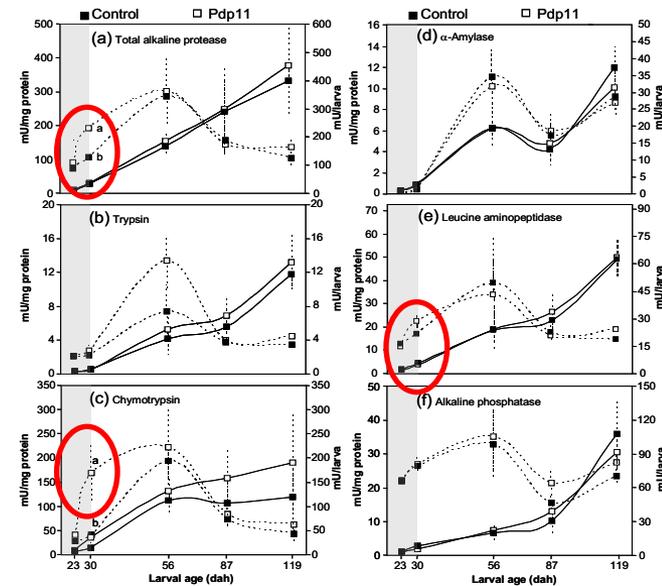


- **En el organismo :**
- * Adelanto y mayor sincronización de la metamorfosis.
- * Reducción de la dispersión de tamaños.



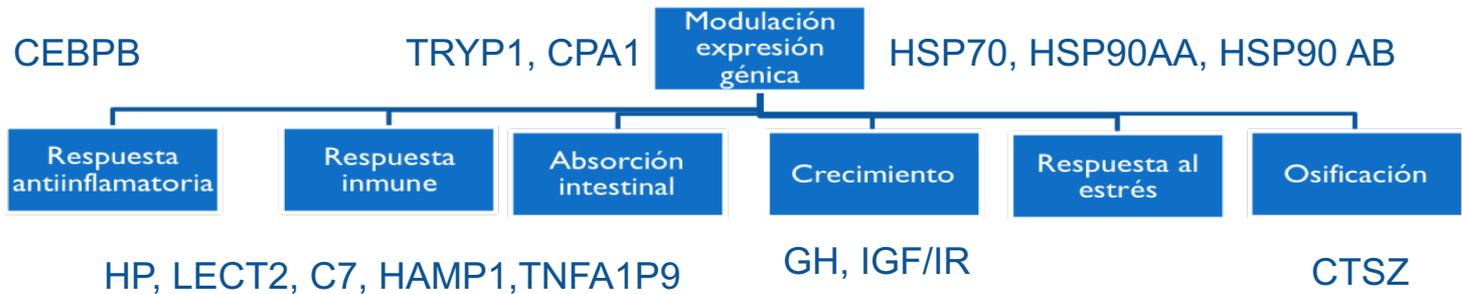
Resultados de Bioencapsulación de *Shewanella* Pdp11 en Cultivo Larvario de Lengüado Senegalés

- 2) En el organismo :
- * Estimulación enzimática y mayor eficiencia nutritiva
- * Mejor composición corporal:
 - a) mejor nivel de proteínas/lípidos
 - b) mejor perfil de ácidos grasos



Perfil a. grasos (%)	Control 23 dpe	Pdp I 23 dpe	Control 56 dpe	Pdp I 56 dpe
DHA	5,65	7,94*	1,83	2,28*
EPA	1,74	2,26*	0,53	0,63*
n-3 HUFAs	9,78	12,94*	3,03	3,79*
PUFAs	33,88	41,78*	12,48	15,22*

Resultados de Bioencapsulación de *Shewanella* Pdp11 en Cultivo Larvario de Lengüado Senegalés



Resultados de Bioencapsulación de *Lactobacillus* BAL 4 y *Lactococcus* Bal 13 en Cultivo Larvario de Lenguado Senegalés

	dpe			
	2-10	9-30	31-45	46-55
BAL4 / BAL13	←————→			
Rotífero, <i>Nannochloropsis gaditana</i> , <i>Isochrysis galbana</i>	←————→			
Artemia, Origreen (Skretting), Gemma micro (Skretting)		←————→		
Gema wean (Skretting)				←————→

	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

Experimentos en Curso y Futuras Perspectivas

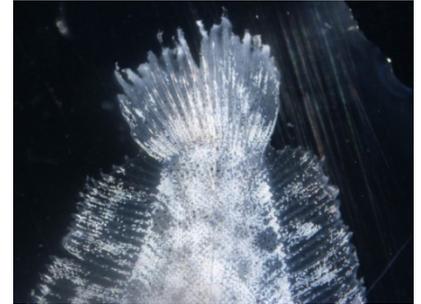
1) En lenguado senegalés:

* Con *Shewanella Pdp11* :

- * influencia sobre la esquelotogénesis
- * aplicación del probiótico inactivado
- * retos bacterianos frente a patógenos de interés

* Con *Lactobacillus BAL 4* y *Lactococcus BAL 13* :

- * análisis de la modulación de la microbiota y expresión génica en intestino
- * estudio de la producción de bacteriocinas



2) En rodaballo:

- * ambos grupos probióticos
- * *Ulva*
- * Aplicación simbiótica (*Ulva*-BAL)



Proyectos y financiación que han permitido estas investigaciones

- *Proyectos financiados por JACUMAR*
- *(2003-2005; 2006-2008; 2009-2011)*

- *Proyectos financiados por Ministerio de Ciencia e Innovación*
- *AGL2005-07454-C02-02 (2006-2008)*
- *AGL2008-05119-C02-02 (2009-2011)*
- *AGL2011-30381-C03-02 (2012-2014)*

- *Proyecto financiado por el Gobierno de Cantabria (2012)*

- *Proyectos financiados por el Instituto Español de Oceanografía*
- *BARMARACU 1 (2014-2016) y BARMARACU 2 (2016-2018)*
- *ROBALU (2018)*

Queremos agradecer la oportunidad de estar aquí
compartiendo nuestra experiencia.
Muchas gracias por vuestra atención

