

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 444**

21 Número de solicitud: 201300741

51 Int. Cl.:

**A23L 1/30** (2006.01)

**A61K 35/64** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**31.07.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**02.03.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/070615**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (50.0%)**

**Avda. Cervantes 2**

**29071 Málaga ES y**

**INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFIA**

**(50.0%)**

72 Inventor/es:

**GARCÍA DE LA BANDA GARCÍA , Inés;**

**LOBO GARCÍA, Carmen;**

**MORIÑIGO GUTIÉRREZ, Miguel Ángel y**

**TAPIA PANIAGUA, Silvana**

54 Título: **Bioencapsulación del probiótico Shewanella putrefaciens Pdp11 en alimento vivo y aplicaciones.**

57 Resumen:

Son objeto de la presente invención procedimientos de bioencapsulación del probiótico Shewanella putrefaciens Pdp11 en alimento vivo; el uso de dicho probiótico como modulador del contenido total de proteínas y lípidos, particularmente de ácido docosahexaenoico (DHA), en alimento vivo, particularmente en Artemia; un alimento probiótico que comprende Shewanella putrefaciens Pdp11 bioencapsulado en alimento vivo, particularmente Shewanella putrefaciens Pdp11 bioencapsulado mediante los procedimientos de bioencapsulación también objeto de la presente invención; y usos de dicho alimento probiótico en la modulación de distintos parámetros bioquímicos y procesos biológicos, tales como la ratio DHA / EPA (ácido docosahexaenoico / ácido eicosapentaenoico), la estimulación de la metamorfosis en larvas, o la composición de la microbiota intestinal en larvas; dichos usos comprendiendo la administración de alimento probiótico en pulsos de diferente duración aplicados en diferentes momentos del desarrollo del pez.

ES 2 530 444 A1

## DESCRIPCIÓN

### Bioencapsulación del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 en alimento vivo y aplicaciones

#### OBJETO DE LA INVENCION

5

La invención se enmarca dentro del campo de la acuicultura, y más particularmente dentro del campo de las bacterias probióticas de aplicación en acuicultura.

10 El objeto de la presente invención lo constituyen procedimientos de bioencapsulación del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 en alimento vivo y de preparación de alimento probiótico que comprende dicho probiótico bioencapsulado, así como aplicaciones de dicho probiótico y de dicho alimento probiótico en la modulación de parámetros bioquímicos y biológicos en especies de uso en acuicultura, particularmente en larvas y alevines de peces, y más  
15 especialmente en peces planos.

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Los principales factores que afectan a la producción de peces, críticos para su éxito comercial, son el control de las enfermedades, el adelanto del destete, el aporte de los requerimientos nutritivos adecuados y la optimización de los protocolos de alimentación (Conceicao *et al.*, 2007; Engrola *et al.*, 2007; Dimitroglou *et al.*, 2011). En concreto, en los peces planos, la gran dispersion de tallas es además una cuestión por resolver a nivel industrial (Flos *et al.*, 2001; Salas-  
25 Leiton *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2010).

Una nutrición larvaria adecuada es un factor decisivo para las siguientes etapas repercutiendo en la calidad de los alevines producidos (Heath & Moore 1997; Dámaso-Rodrigues *et al.*, 2010; Alves-Martins *et al.*, 2011; Boglino) y por tanto en el éxito comercial del cultivo.

30 El alimento vivo tiene un fuerte impacto en la primera alimentación de peces, y las fluctuaciones que se producen en la microbiota digestiva de las larvas

son reflejo de los microorganismos existentes en las presas vivas ingeridas más que los presentes en el agua de cultivo (Carnevali et al., 2006; Suzer et al., 2008). De este modo, las primeras bacterias que atraviesan el tubo digestivo resultan de gran importancia porque pueden establecerse en el mismo y evolucionar hacia una microbiota que persista en el tiempo (Huys et al., 2001).

El bajo nivel de microbiota autóctona en los estadios larvarios de peces contribuye a la menor digestión de las dietas comerciales (Campbell y Buswell, 1983). Por ello se utilizan protocolos de coalimentación con dietas viva e inerte que mejoran la supervivencia y el crecimiento en larvas de numerosas especies de peces (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Alves et al., 2006; Engrola et al., 2007). En este sentido un suplemento probiótico con bacterias seleccionadas podría suponer una mejora en la estrategia de alimentación, especialmente durante la metamorfosis y el destete.

Además las larvas de peces están expuestas a desórdenes asociados a la microbiota debido a que comienzan a alimentarse cuando el tracto digestivo no está completamente desarrollado (Stottrup y McEvoy, 2003; Rodríguez et al., 2009) y el sistema inmune está todavía incompleto (Vadstein, 1997). Por esta razón los tratamientos con probióticos son particularmente indicados en estas etapas, cuando la vacunación por inyección no se puede llevar a cabo (Vine et al., 2006; Tinh et al., 2008).

En los últimos años la investigación en probióticos se ha visto incrementada en acuicultura de peces, dados los efectos beneficiosos previamente observados en ganadería (Fulton *et al.*, 2002; Khuntia & Chaudhary, 2002) y humanos (Gill, 2003; Panigrahi *et al.*, 2004). Aunque existen investigaciones referentes a la aplicación de bacterias acidolácticas en larvas de peces (Gatesoupe et al., 1989; Gatesoupe, 1992; Carnevali et al., 2006;; Suzer et al., 2008; Abelli et al., 2009; Avella et al., 2010a, 2011), las condiciones ambientales del medio acuático sugieren seleccionar cepas autóctonas de los especímenes ó del medio natural (Chabrilón *et al.*, 2005a, b; Lauzon *et al.*, 2010).

Este es el caso de *Shewanella putrefaciens* Pdp11, una bacteria aislada de la piel de doradas sanas. Se conoce entre otras su capacidad de protección en peces

(doradas y lenguados) frente a la inoculación con patógenos bacterianos (en concreto frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) y promoción de su bienestar (García de la Banda et al., 2011; Ruíz-Jarabo et al., 2011; Tapia-Paniagua et al., 2011, 2012).. La incorporación de dicho probiótico al pienso de juveniles de  
5 lenguado *S. senegalensis* (Sáenz de Rodrigáñez et al., 2009; García de la Banda et al., 2010, 2012; Tapia-Paniagua et al., 2010, 2012) y de dorada *S. aurata* (Salinas et al., 2006; Varela et al., 2010) ha demostrado efectos beneficiosos para el crecimiento y la resistencia frente a enfermedades. Estos positivos resultados son referidos en las solicitudes de patente ES2389364 A1 y ES2390428 A1. Sin  
10 embargo, los procedimientos descritos en el estado de la técnica que hacen uso de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 no se han demostrado igualmente eficaces frente a los principales problemas asociados al cultivo de peces, y especialmente de peces planso, en los primeros estadios, como son: producción de alevines de calidad, necesidad de reducción del consumo de alimento vivo, dificultad en la asimilación  
15 del alimento inerte, estancamiento del crecimiento durante el destete, realización de continuas labores de clasificación asociadas a la elevada dispersión de tamaños, susceptibilidad a las especies oportunistas y patógenas del medio de cultivo en especial en el traslado y manipulación de ejemplares.

Con objeto de superar dichos problemas, no resueltos por el estado de la  
20 técnica, la presente invención describe y reivindica procedimientos de bioencapsulación del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 en alimento vivo y de preparación de alimento probiótico que comprende dicho probiótico bioencapsulado, así como aplicaciones de dicho probiótico y de dicho alimento probiótico en la modulación de parámetros bioquímicos y biológicos en especies de  
25 uso en acuicultura, particularmente en larvas y alevines de peces, y más especialmente en peces planos.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

30 *Shewanella putrefaciens* Pdp11 ha sido incorporada como células vivas en alimento vivo (Artemia, rotífero) habitualmente empleado en la alimentación

durante los primeros estadios de cultivo larvario y destete de peces, particularmente de peces planos, más particularmente de peces del género Solea, y más particularmente en lenguado *S. senegalensis*. Consecuentemente, un primer objeto de la presente invención es un procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 en alimento vivo que comprende al menos una etapa de incorporación de dicho probiótico a alimento vivo durante un período de tiempo adecuado.

Se ha demostrado un efecto modulador del probiótico así incorporado a alimento vivo, particularmente a Artemia, sobre el contenido total de proteínas y lípidos, particularmente de ácido docosahexaenoico, en dicho alimento vivo; y por tanto es un segundo objeto de la presente invención es el uso de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 como modulador del contenido total de proteínas y lípidos, particularmente de ácido docosahexaenoico (DHA), en alimento vivo, particularmente en Artemia

Adicionalmente, de forma previa a la etapa de incorporación del probiótico a alimento vivo puede ser oportuno preparar una solución que comprenda dicho probiótico. De este modo, es objeto de la presente invención un procedimiento de bioencapsulación que comprende, además de la etapa de incorporación del probiótico a alimento vivo, una etapa de preparación de la solución que comprenda las bacterias probióticos.

Alternativamente, de forma previa a la preparación de la solución que comprenda el probiótico puede ser oportuno el cultivo de las bacterias probióticas. Por tanto, es objeto de la presente invención un procedimiento de bioencapsulación que comprende, además de las etapas de preparación de la solución del probiótico Pdp11 y de incorporación de dicho probiótico en solución a alimento vivo, una etapa de cultivo de *Shewanella putrefaciens* Pdp11.

Como resultado del procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putrefaciens* Pdp11, en cualquiera de las variantes referidas en la presente invención, se obtiene un alimento probiótico. Consecuentemente, es objeto de la presente invención un alimento probiótico que comprende *Shewanella putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en alimento vivo, particularmente *Shewanella putrefaciens* Pdp11

bioencapsulado mediante una de las varias del procedimiento de bioencapsulación también objeto de la presente invención.

Se ha demostrado un efecto modulador del alimento probiótico que comprende *Shewanella putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en alimento vivo sobre  
 5 diferentes parámetros bioquímicos y procesos biológicos, tales como la ratio DHA / EPA (ácido docosahexaenoico / ácido eicosapentaenoico), la estimulación de la metamorfosis en larvas, o la composición de la microbiota intestinal en larvas. Conforme con dichas evidencias experimentales, son objeto de la presente invención diferentes usos de dicho alimento probiótico en la modulación de distintos  
 10 parámetros bioquímicos y procesos biológicos, dichos usos comprendiendo la administración de alimento probiótico en pulsos de diferente duración aplicados en diferentes momentos del desarrollo del pez.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

**Figura 1.** Esquema de alimentación y evolución de la **(a)** longitud total (mm) y **(b)** el peso seco (mg) en ejemplares de lenguado senegalés alimentados con dieta Control y suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (10-86 dpe) experimento 1. \* Indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos.

20

**Figura 2.** Esquema de alimentación y evolución de **(a)** la longitud total (mm) y **(b)** el peso seco (mg) en ejemplares de lenguado senegalés alimentados con dieta Control y suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (10-30 dpe) experimento 2. \* Indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos

25

**Figura 3.** Esquema de alimentación y evolución de **(a)** la longitud total (mm) y **(b)** el peso seco (mg) en ejemplares de lenguado senegalés alimentados con dieta Control y suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (2-21 dpe) experimento 3. \* Indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos

30

**Figura 4.** Evolución de estadios (E0-E4) en la metamorfosis de ejemplares de

lenguado senegalés alimentados con dieta **(a)** Control y **(b)** suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (2-21 dpe) experimento 3.

**Figura 5.** Evolución de la reabsorción de la vejiga natatoria en la metamorfosis de  
5 ejemplares de lenguado senegalés alimentados con dieta **(a)** Control y **(b)** suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (2-21 dpe) experimento 3.

**Figura 6.** Evolución de las actividades enzimáticas digestivas: **(a)** proteasa alcalina  
10 total, **(b)** tripsina y **(c)** quimitripsina en homogeneizados de digestivos en ejemplares de lenguado senegalés (23-119 dpe) alimentados con dietas Control y suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 en pulso corto (10-30 dpe). Las líneas discontinuas y continuas representan actividades enzimáticas específicas (U/mg proteína) e individuales (U/larva) respectivamente. Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

15

**Figura 7.** Agrupamiento de los patrones de PCR-DGGE obtenidos de la microbiota  
intestinal de alevines de lenguado (90 dpe) alimentados con dietas Control y  
suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11, y que fueron calculados a partir de los  
coeficientes de similitud de Cosine. El perfil de la banda central pertenece a la  
20 cepa *S. putrefaciens* Pdp11 en cultivo axénico.

**Figura 8.** Agrupamiento de los patrones de PCR-DGGE obtenidos de la microbiota  
intestinal de **(a)** larvas de lenguado recién metamorfoseadas (23 dpe), **(b)** postlarvas  
de lenguado iniciando el destete (56 dpe), **(c)** postlarvas de lenguado finalizando el  
25 destete (87 dpe), y **(d)** alevines de lenguado al mes de finalizado el destete (117  
dpe); alimentados con dietas Control y suplementadas con *S. putrefaciens* Pdp11, y  
que fueron calculados a partir de los coeficientes de similitud de Cosine.

**Tabla 1.** Dispersión de tallas al final de la metamorfosis y el destete en ejemplares  
30 de lenguado *S. senegalensis* alimentados con *Artemia* Control y suplementada con  
*S. putrefaciens* Pdp11 en pulso largo (experimento 1) y pulso corto (experimento 2).

(Media  $\pm$  desviación estándar). Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

5 **Tabla 2.** Contenido total en proteínas y lípidos (% de peso seco) en *Artemia* y alevines (90dpe) y larvas (23 dpe) de lenguado senegalés alimentados con dietas Control y suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11, en pulso largo (exp. 1) y corto (exp. 2) (Media  $\pm$  desviación estándar). Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

10 **Tabla 3.** Perfil de los principales ácidos grasos (% de peso seco) en *Artemia* y alevines (90dpe) y larvas (23 dpe) de lenguado senegalés alimentados con dietas Control y suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11, en pulso largo (exp. 1) y corto (exp. 2) (Media  $\pm$  desviación estándar). Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

15

## MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

20 **Procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 en alimento vivo**

A título ilustrativo, se procede a continuación a describir un modo de realización de dicho procedimiento que comprende las etapas de (a) cultivo de la cepa Pdp11, (b) preparación de la solución que contiene las bacterias probióticas, e (c) incorporación  
25 al alimento vivo durante un tiempo adecuado; así como modos de utilización del alimento probiótico resultante que comprenden diferentes (d) pulsos de adición óptimos en el cultivo larvario

30 **a) Cultivo de la cepa Pdp11**

Se parte de células enteras de la cepa Pdp11 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con referencia CECT 7627. Dichas células son cultivadas



en 5mL de caldo de triptona de soja (Oxoid Ltd., Basingstoke, Gran Bretaña) suplementado al 1.5% con NaCl (TSBs), durante 18 h a 22°C, en continua agitación. Se toman alícuotas de 0.1mL de cultivo que se siembran en placas de agar de triptona de soja (Difco™, Sparks, Estados Unidos), suplementadas con NaCl (1.5%) (TSAs) y se incuban diariamente a 22°C.

**b) Preparación de la solución que contiene las bacterias probióticas**

La solución bacteriana se prepara recogiendo las células de las placas de TSAs y suspendiéndolas en tampón fosfato salino estéril (PBS, pH 7.2). A continuación se determina su densidad óptica a 600nm (Absorbancia  $1 = 10^{12}$  ufc mL<sup>-1</sup>) mediante espectrofotometría para comprobar la concentración bacteriana de la solución. El número de placas con cultivo bacteriano que se emplee estará en relación a los volúmenes de los incubadores de alimento vivo (rotífero y *Artemia*).

**c) Incorporación al alimento vivo durante un tiempo adecuado**

Se añade la solución bacteriana a una concentración de  $2.5 \cdot 10^7$  y  $4.5 \cdot 10^7$  ufc mL<sup>-1</sup> a los incubadores de alimento vivo (45 L) al menos 3 horas antes de su administración a las larvas. Esta dosis es eficaz en concentraciones de presa viva entre 50-400 individuos mL<sup>-1</sup> para la *Artemia* y entre 70-700 individuos mL<sup>-1</sup> para el rotífero, lo que cubre las densidades de cultivo habituales en las instalaciones piscícolas. El tiempo de bioencapsulación ensayado con éxito está entre 3 y 9 horas, por lo que la misma debe de realizarse a diario para su adecuado suministro en varias tomas. Las dos tomas de rotífero y al menos tres de las cuatro tomas de *Artemia* incorporarán *S. putrefaciens* Pdp11 el cual constituirá el 50% del contenido bacteriano total de la presa viva. Este hecho es fundamental en el sentido de la colonización del probiótico y de la reducción de la proliferación de bacterias oportunistas y patógenas. La existencia de varias tomas de presa viva en el cultivo larvario previene de la digestión y normal vaciado en el tiempo observado (1/3 en la primera hora). El suministro propuesto cada 3 horas asegura una correcta

incorporación del probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 a la larva.

**Administración de un alimento probiótico obtenido mediante un procedimiento que comprende la bioencapsulación de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 en alimento vivo**

Como se ha mencionado anteriormente, como resultado del procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putrefaciens* Pdp11, en cualquiera de las variantes referidas en la presente invención, se obtiene un alimento probiótico, habiéndose demostrado un efecto modulador de dicho alimento probiótico sobre diferentes parámetros bioquímicos y procesos biológicos tras la administración de alimento probiótico en pulsos de diferente duración aplicados en diferentes momentos del desarrollo del pez.

**15 Pulsos de adición de *S. putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado**

**Experimento 1**

Inicialmente se ensaya con éxito un pulso largo de adición de *S. putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en *Artemia* desde el inicio de la metamorfosis hasta el final del destete (10-86 dpe).

Los embriones fueron obtenidos a partir de una puesta natural de reproductores de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) en cautividad del Instituto Español de Oceanografía (Santander, España). Los huevos fueron mantenidos a 19.0° ± 0.5°C en incubadores cilindro-cónicos con una leve aireación y flujo continuo de agua de 0.5 L min<sup>-1</sup>. Las larvas recién eclosionadas (40 larvas L<sup>-1</sup>) fueron distribuidas en tanques circulares de poliéster de 280 L con aireación y renovación de agua constantes. La temperatura fue de 18.3 ± 0.8°C hasta el día 87 de cultivo, siendo de 21.0 ± 1.6°C a partir de entonces. La salinidad fue de 35.4 g L<sup>-1</sup> a lo largo del experimento. La iluminación (1000 lux en la superficie del agua) fue continua durante los 10 días posteriores a la eclosión (dpe) y se estableció un

fotoperiodo de luz:oscuridad de 12:12 hasta el día 21 de cultivo, mientras que fue de 0:24 después de la etapa pelágica (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999). La renovación de agua se mantuvo entre el 5% y el 80% (desde el día 2 hasta el 21 dpe) aumentando a partir del inicio del destete hasta alcanzar el 400%. Estas condiciones de renovación de agua mantuvieron unos niveles de Oxígeno y Nitritos  
 5 adecuados para el cultivo larvario y postlarvario del lenguado (Lund et al., 2008; Parra y Yúfera 1999, 2002). En el día 24 dpe, una vez que las larvas superaron la metamorfosis y pasaron a ser bentónicas, los tanques fueron vaciados y se determinó su supervivencia. Posteriormente los peces de cada tratamiento fueron distribuidos  
 10 al azar en los tanques con una densidad de 6000 individuos  $m^{-2}$ . Debido a la alta densidad de cultivo, de cada réplica se retiraron postlarvas el día 46 de cultivo hasta ajustar la densidad a 4000 individuos  $m^{-2}$ . Finalmente, tres días después del final del destete (90 dpe) se vaciaron todos los tanques y los alevines fueron distribuidos de nuevo al azar con una densidad de 1500 individuos  $m^{-2}$  hasta el final del  
 15 experimento (121 dpe).

El protocolo de alimentación estuvo basado en Cañavate y Fernández-Díaz (1999) y queda reflejado en la Figura 1. Entre los días 3 y 9 dpe se añadieron a los tanques larvarios rotíferos enriquecidos con *Isochrysis galbana* dos veces al día para mantener una densidad de rotíferos de 20 individuos  $mL^{-1}$ . Las microalgas  
 20 (*Nannochloropsis gaditana*,  $3 \cdot 10^5$  cel  $mL^{-1}$  e *Isochrysis galbana*,  $5 \cdot 10^4$  cel  $mL^{-1}$ ) también fueron añadidas al cultivo durante este periodo para asegurar una adecuada calidad en los rotíferos. Desde el día 10 dpe y hasta el 60 dpe se introdujo la coalimentación con *Artemia* y dieta inerte comercial Gemma Micro (lípidos totales 15%, proteína cruda 55%, Skretting, Burgos, España). Los nauplios de *Artemia*  
 25 (variedad AF INVE Aquaculture, Ghent, Bélgica), fueron añadidos entre los días 10 y 12 dpe y posteriormente fueron los metanauplios (variedad EG INVE Aquaculture, Ghent, Bélgica). Ambos estadios de *Artemia* fueron enriquecidos previamente con DHA Super Selco (INVE Aquaculture, Ghent, Bélgica), durante 18 horas y posteriormente añadidos a los tanques cuatro veces al día, mientras que la dieta seca  
 30 lo fue según ocho tomas (cuatro por la noche). Las dosis de *Artemia* aumentaron desde 2 a 14 metanauplios  $mL^{-1}$ . El destete comenzó el día 60 dpe y finalizó el 87

dpe, momento en el que las larvas pasaron a ser alimentadas sólo con dieta inerte (lípidos totales 17%, proteína cruda 58%, Gemma Wean, Skretting, Burgos, España). La cantidad de dieta inerte se aumentó gradualmente del día 60 dpe (11.2 g m<sup>-2</sup>, 45.5% del alimento total) al 87 dpe (39.2 g m<sup>-2</sup>), mientras que la dosis de *Artemia* fue progresivamente reducida desde los 14 metanauplios mL<sup>-1</sup>. Al final del experimento, los alevines fueron alimentados al 7% de la biomasa total existente en cada tanque. Se compararon dos regímenes de alimentación: Probiótico y Control. El grupo Probiótico fue el que recibió la cepa bacteriana *S. putrefaciens* Pdp11 entre los días 10 y 86 dpe empleando la *Artemia* como vector. El tratamiento probiótico fue dado tres veces al día mientras que ninguna bacteria fue administrada al grupo Control. Cada dieta fue valorada por triplicado.

### Experimento 2

Posteriormente se reduce el pulso probiótico (10-30 dpe) y se observan los mismos efectos junto con los relacionados con la actividad enzimática y la metamorfosis. A pesar del corto periodo de adición resulta de sumo interés la permanencia del probiótico en el intestino 3 meses más tarde (117 dpe).

Los embriones fueron obtenidos a partir de una puesta natural de reproductores de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) y mantenidos a 19.0 ± 0.5°C en incubadores cilindro-cónicos en las mismas condiciones que en el experimento 1. Las larvas recién eclosionadas (40 larvas L<sup>-1</sup>) fueron distribuidas en tanques circulares de poliéster de 250 L con aireación y renovación de agua constantes. La temperatura fue de 17.8 ± 0.8°C hasta el día 56 de cultivo, siendo de 18.9 ± 0.4°C hasta día 85 y 19.6° ± 1.1°C hasta el final del experimento. Las condiciones de salinidad, iluminación y renovación de agua se mantuvieron semejantes a las del experimento 1. Una vez las larvas superaron la metamorfosis y pasaron a ser bentónicas se procedió como en el experimento 1, determinándose su supervivencia y distribuyéndose al azar en los tanques.

El protocolo de alimentación fue similar al del experimento 1, si bien se redujo ligeramente el tiempo de destete. Sin ningún cambio en el enriquecimiento

de rotífero, destacar el diferente enriquecedor empleado para Artemia (Origreen, Skretting). Los momentos de inicio y final de destete quedan también señalados en la Figura 2. La diferencia fundamental de este segundo experimento consistió en la reducción del pulso de adición probiótico. *S. putrefaciens* Pdp11 fue bioencapsulado en Artemia y añadido a las larvas de lenguado senegalés tan sólo de día 10 a día 30 de cultivo. La concentración del probiótico y las dosis diarias se mantuvieron como en el primer experimento.

### Experimento 3

10

Finalmente se se ensaya un nuevo pulso corto de 19 días (2-20 dpe) adelantando la adición del probiótico al inicio de la alimentación exógena con el objeto de obtener una mayor modulación sobre la microbiota y una incidencia mayor sobre la metamorfosis.

15

Los embriones fueron obtenidos a partir de una puesta natural de reproductores de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) y mantenidos a  $19.3^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  en incubadores cilindro-cónicos en las mismas condiciones que en los experimentos anteriores. Las larvas recién eclosionadas ( $40 \text{ larvas L}^{-1}$ ) fueron distribuidas en tanques circulares de poliéster de 250 L con aireación y renovación de agua constantes. La temperatura fue de  $19.3^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  hasta el día 21 dpe y  $17.4 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$  desde entonces hasta el final del experimento. Las condiciones de salinidad, iluminación y renovación de agua se mantuvieron semejantes a las de los experimentos anteriores. Una vez las larvas superaron la metamorfosis y pasaron a ser bentónicas se procedió como en los experimentos 1 y 2, determinándose su supervivencia y distribuyéndose al azar en los tanques.

20

25

El protocolo de alimentación base fue similar al de los experimentos 1 y 2. No hay diferencias en cuanto al enriquecedor del alimento vivo (rotífero y Artemia) respecto al experimento 2, si en lo concerniente al microencapsulado (Biomar, en lugar de Skretting). El tiempo de destete fue aún más reducido (46-64 dpe), como queda señalado en la Figura 3. La diferencia fundamental de este tercer experimento consistió en el momento escogido para el pulso de adición probiótica. Así *S.*

30

*putrefaciens* Pdp11 fue bioencapsulado en tanto en rotífero (2-10 dpe) como en *Artemia* (10-20 dpe). La concentración del probiótico y las dosis diarias se mantuvieron como en los anteriores experimentos.

5 **Efectos de un alimento probiótico obtenido mediante un procedimiento que comprende la bioencapsulación de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 en alimento vivo**

10 A continuación, y a título ilustrativo, se describen diferentes efectos de dicho alimento demostrados. Los referidos efectos están relacionados con los siguientes parámetros bioquímicos y procesos biológicos: Crecimiento, dispersión de tallas, adelanto y sincronización de la metamorfosis, composición bioquímica de *Artemia* y larvas y alevines, actividad enzimática digestiva, y colonización y modulación de la microbiota intestinal.

15

**Crecimiento**

**Experimento 1**

20 El crecimiento en longitud fue significativamente superior ( $P < 0.05$ ) para los peces alimentados con *S. putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en *Artemia* en pulso largo (10-86 día posterior a eclosión –dpe-) ya al finalizar la metamorfosis (24 dpe) y desde el destete (74-121 dpe), siendo el crecimiento en peso significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) desde la alimentación inerte (87 dpe). Estos resultados se exponen  
25 en las figuras 1a y 1b.

**Experimento 2**

30 El crecimiento en longitud y peso fue significativamente superior ( $P < 0.05$ ) para los peces alimentados con *S. putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en *Artemia* en pulso corto (10-30 dpe) desde el final de la metamorfosis hasta finalizar

el experimento, como se muestra en la figuras 2a y 2b.

### Experimento 3

5 El crecimiento en longitud y peso fue significativamente superior ( $P < 0.05$ ) para los peces alimentados con *S. putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en rotífero (2-9 dpe) y *Artemia* (10-21 dpe) desde el inicio de la metamorfosis hasta finalizar el destete, como se muestra en las figuras 3a y 3b.

### 10 **Dispersión de tallas**

#### Experimentos 1 y 2

15 Al finalizar el destete se registró una menor heterogeneidad de tamaños en el grupo *S. putrefaciens* Pdp11 de ambos experimentos, con un Coeficiente de variación (CV) de 14.4% y 8.9% frente al Control (24.5% y 12.9%) al finalizar el destete. Estos resultados se muestran en la Tabla 1.

### **Metamorfosis**

20

#### Experimento 3

La adición de *S. putrefaciens* Pdp11 desde la primera alimentación exógena (2 dpe) promueve en los ejemplares cultivados a  $19.3 \pm 0.5^\circ\text{C}$ :

25 . Una reducción en el periodo necesario para que el 100% de los ejemplares completen la metamorfosis de entre 24 y 48 horas (Figuras 4a y 4b).

. Una mayor sincronización de la metamorfosis, apreciándose una menor dispersión respecto a las fases de metamorfosis en la que se encuentran los ejemplares (Figura 4).

30 . Una más temprana reabsorción de la vejiga natatoria de las larvas, apreciándose que el 50% de reabsorción ocurre entre los días 15-16 (frente al día 18

en el grupo control) (Figuras 5a y 5b).

Todos estos acontecimientos facilitan el paso de los ejemplares a la alimentación bentónica y promueve una menor dispersión de tallas posterior en los mismos (efecto este último ya descrito en el apartado anterior). El efecto probiótico de *S. putrefaciens* Pdp11 sobre el final de la metamorfosis (cierre de la vejiga) se ha observado también en otros dos experimentos con sendos rangos de temperatura de  $17.9 \pm 0.6^\circ\text{C}$  y  $17.1 \pm 0.6^\circ\text{C}$ .

### **Composición bioquímica en *Artemia*, larvas y alevines**

10

#### Modulación del nivel de proteínas y lípidos en *Artemia*

Independientemente del enriquecedor comercial de *Artemia* utilizado (DHA SuperSelco de INVE en el experimento 1 y ORIGREEN de Skretting en el experimento 2) la adición de *S. putrefaciens* Pdp11 incrementa el contenido proteico del alimento, siendo este aumento significativo ( $P < 0.05$ ) en el primer caso. En consecuencia los peces alimentados con Pdp11 bioencapsulado en *Artemia* mostraron un contenido significativamente superior ( $P < 0.05$ ) de proteína soluble finalizado el destete (experimento 1). Este hecho no se observa al finalizar la metamorfosis, en dónde el alto nivel de proteasas de los ejemplares alimentados con Pdp11 proporciona un mayor nivel de péptidos y aminoácidos disponibles para el crecimiento de las postlarvas en este estadio de desarrollo (experimento 2). Ambos resultados se muestran en las tablas 2 y 3.

En cuanto al contenido de lípidos totales no se encuentran diferencias significativas en la *Artemia* suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 y tampoco en los peces alimentados con el probiótico frente al Control (experimento 1). Sin embargo cuando los niveles de lípidos del enriquecedor son más bajos (experimento 2) la adición de Pdp11 incrementa significativamente los mismos en la *Artemia* y en consecuencia en los ejemplares finalizada la metamorfosis. Estos resultados se muestran en las tabla 2.

30



Modulación del contenido y perfil de ácidos grasos en *Artemia*

La bioencapsulación de Pdp11 en *Artemia* modifica el perfil de ácidos grasos. Destaca la influencia que tiene sobre el ácido docosahexaenoico (22:6n-3; 5 DHA) aumentando sus niveles de manera significativa en el alimento vivo en ambos experimentos ( $P < 0.05$ ). Esta modulación se corresponde con un incremento de DHA a nivel larvario y de alevines aunque no a nivel significativo. El incremento de este ácido graso esencial para el desarrollo neurológico y de la visión se traduce en un mayor índice DHA/EPA, presentando niveles significativos en el experimento 10 1. Estos resultados se muestran en la tabla 3.

**Actividades enzimáticas digestivas**Experimento 2

15

Las actividades proteasa alcalina y quimiotripsina presentaron valores significativamente superiores ( $P < 0.05$ ) en los ejemplares alimentados con *Artemia* Pdp11 después de la metamorfosis (30 dpe) (Figs. 6a y 6c). Asimismo se observó una tendencia a valores superiores en las actividades tripsina y quimiotripsina 20 durante el destete (64 dpe) según se muestra en la figura 6b. Esta mayor actividad proteolítica registrada se relaciona con el mayor crecimiento observado como consecuencia de una mayor digestión de la dieta inerte.

**Modulación de la microbiota intestinal**

25

Experimento 1

Los resultados mostraron como *S. putrefaciens* Pdp11 bioencapsulada en *Artemia* y añadida en pulso largo (10-86 dpe) modula la microbiota intestinal en 30 alevines de lenguado senegalés (90 dpe). Los patrones de PCR-DGGE de la microbiota intestinal de ejemplares alimentados con la dieta Probiótica son

diferentes a los que recibieron la dieta Control (Figura 7). Resulta interesante observar como 7 de los 9 alevines que recibieron la dieta probiótica estuvieron claramente agrupados, mientras que únicamente 2 ejemplares mostraron unos patrones de PCR-DGGE con una similitud más cercana a la de los peces Control. En este sentido 3 de los patrones de PCR-DGGE correspondientes a los alevines alimentados con la dieta Probiótica presentan una banda en la misma posición que la correspondiente al cultivo axénico de *S. putrefaciens* Pdp11, verificándose su presencia mediante secuenciación (98% de similitud).

## 10 Experimento 2

Los resultados indican que un pulso corto de administración de Pdp11 bioencapsulada en *Artemia* (10-30 dpe) es suficiente para ejercer una modulación significativa de la microbiota intestinal. Los patrones de PCR-DGGE de la microbiota intestinal en los peces alimentados con la dieta Probiótica son diferentes a los de los peces que recibieron la dieta Control en todas las fases de desarrollo (Figuras 8a, b, c y d).

Resaltar que dicha modulación se mantiene más de tres meses (hasta al menos el 117 dpe) finalizada la adición probiótica. Con estos resultados se confirma la colonización del probiótico Pdp11 en la mucosa intestinal hecho previsible tras los resultados del experimento 1, y que resulta fundamental para su aplicación industrial.

La presencia de *S. putrefaciens* Pdp11 en el intestino de larvas y alevines va a determinar la microbiota existente. De este modo se ha observado la presencia de especies asociadas a Pdp11 como *Shewanella* ANA, *Lactobacillus helveticus*, *Mycoplasma mycroti*, *Pseudomonas acephalitica*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio sp. Pelg 091* y *Rhodoccus* TM1 que no aparecen en el digestivo de los ejemplares Control. Si bien en todo cultivo de peces existe una evolución de la microbiota relacionada con la alimentación viva e inerte, la colonización probiótica de Pdp11 es capaz de prevenir la colonización del digestivo de larvas de 23 dpe por posibles bacterias patógenas y oportunistas como es el caso

de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y diferentes especies del género *Vibrio* sp.

### **Principales conclusiones**

5

El probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en alimento vivo (Artemia, rotífero), administrado durante el estadio larvario y postlarvario de peces, modula la microbiota intestinal y estimula la actividad enzimática digestiva, factores que mejoran el estado nutritivo, la sincronización de la metamorfosis y el crecimiento larvario y destete en alevines de peces planos. Más aún, el probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 incluso mejora la calidad nutritiva del alimento vivo, tras su bioencapsulación en el mismo.

El probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 así administrado (bioencapsulado en alimento vivo) es capaz de colonizar el digestivo y permanecer más de 3 meses después de un pulso de administración de 20 días en el alimento vivo, modulando la microbiota digestiva impidiendo la colonización de posibles patógenos y oportunistas. Asimismo, el probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 estimula la actividad enzimática necesaria para una digestión y asimilación eficaz de los piensos comerciales propios de estas fases de desarrollo. Esta característica contribuye a la reducción de costes derivados del empleo del alimento vivo en los criaderos de peces.

Se han ensayado varios protocolos de administración y se ha seleccionado el consistente en pulsos probióticos durante 20 días, estableciéndose como periodo óptimo de adición el estadio larvario (2-20 dpe, 10-30 dpe).

25

### **APLICACIÓN INDUSTRIAL**

La gran ventaja de esta cepa, además de presentar actividad antibacteriana frente a los principales patógenos del lenguado *S. senegalensis*, tanto “in vitro” como “in vivo”, consiste en el abanico de efectos positivos que promueve. Estos efectos comprenden la colonización y modulación de la microbiota intestinal y la estimulación enzimática, factores que mejoran el estado nutritivo, la sincronización

de la metamorfosis y el crecimiento larvario y destete en alevines de peces planos. Su administración en las primeras etapas de desarrollo estandariza y mejora la condición larvaria y de alevines de peces en cultivo. Estas características brindan al sector empresarial una mayor calidad de producción, al tiempo que fortalecen a los  
5 ejemplares frente al transporte y manejo propios de estas fases de desarrollo.

Dado el interés comercial de la producción de peces planos que tienen gran aceptación por parte del consumidor y el buen resultado obtenido juveniles de lenguado senegalés con la administración de la cepa *S. putrefaciens* Pdp11, se presenta la siguiente patente de invención.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 en alimento vivo caracterizado por que comprende una etapa de incorporación de células vivas de la cepa Pdp11 (*Shewanella putresfaciens*) depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con referencia CECT 7627 a alimento vivo durante un período de tiempo adecuado.
2. Procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 en alimento vivo según la reivindicación anterior caracterizado por que el alimento vivo comprende Artemia.
3. Procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 en alimento vivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 ó 2 caracterizado por que el alimento vivo comprende rotíferos.
4. Procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 en alimento vivo según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3 caracterizado por que comprende la adición al alimento vivo de una solución con una concentración de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 comprendida en el rango  $2.5 \cdot 10^7 - 4.5 \cdot 10^7$  ufc mL<sup>-1</sup>.
5. Procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 en alimento vivo según la reivindicación anterior caracterizado por que la adición de la solución de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 se realiza entre 3 y 9 horas antes del momento previsto para la administración de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 bioencapsulado a los peces.
6. Procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 en alimento vivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 4 ó 5 caracterizado por que la adición de la solución de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 se realiza a un alimento vivo que comprende Artemia en una concentración comprendida en el rango 50-400 individuos mL<sup>-1</sup>.
7. Procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 en alimento vivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 4 a 6 caracterizado por que la adición de la solución de *Shewanella putresfaciens*

Pdp11 se realiza a un alimento vivo que comprende rotífero en una concentración comprendida en el rango 70-700 individuos mL<sup>-1</sup>.

8. Procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 en alimento vivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 7  
5 caracterizado por que comprende una etapa de preparación de la solución de *Shewanella putresfaciens* Pdp11.
9. Procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 en alimento vivo según la reivindicación anterior caracterizado por que la etapa de preparación de la solución de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 comprende la  
10 resuspensión de una masa bacteriana de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 en tampón fosfato salino (PBS).
10. Procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 en alimento vivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 9  
15 caracterizado por que comprende una etapa de cultivo de *Shewanella putresfaciens* Pdp11.
11. Procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 en alimento vivo según la reivindicación anterior caracterizado por que la etapa de cultivo de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 comprende (a) su siembra en medio  
20 líquido Triptona de Soja suplementado con NaCl hasta el 1,5% de concentración final (TSBs) y (b) la incubación durante 18 horas a 22 °C.
12. Procedimiento de bioencapsulación de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 en alimento vivo según la reivindicación anterior caracterizado por que la etapa de cultivo de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 comprende además (c) la toma de  
25 alícuotas de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 sembrada e incubada conforme la reivindicación anterior, (d) la siembra de dicha alícuotas en medio sólido de Triptona de Soja suplementado con NaCl hasta el 1,5% de concentración final (TSAs), y (e) la incubación a 22 °C.
13. Uso de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 como agente modulador del contenido total de proteínas y lípidos en alimento vivo para peces.

14. Uso de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 según la reivindicación anterior como agente modulador del contenido de ácido docosahexaenoico (DHA) en alimento vivo para peces.
- 5 15. Uso de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 13 ó 14 caracterizado por que comprende la bioencapsulación de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 en alimento vivo mediante un procedimiento conforme al reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 13.
16. Uso de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 caracterizado por que el alimento vivo comprende Artemia.
- 10 17. Alimento probiótico que comprende células vivas *Shewanella putresfaciens* Pdp11 bioencapsuladas en alimento vivo.
18. Alimento probiótico según la reivindicación anterior caracterizado por que las células vivas *Shewanella putresfaciens* Pdp11 que comprende han sido bioencapsuladas en alimento vivo mediante un procedimiento conforme al  
15 reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 13.
19. Uso de un alimento probiótico reivindicado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 17 ó 18 como agente modulador de la ratio DHA / EPA (ácido docosahexaenoico / ácido eicosapentaenoico) en peces.
- 20 20. Uso de un alimento probiótico reivindicado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 17 ó 18 como agente estimulador de la metamorfosis en larvas de peces.
21. Uso de un alimento probiótico reivindicado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 17 ó 18 como agente estimulador del crecimiento en larvas de peces.
- 25 22. Uso de un alimento probiótico reivindicado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 17 ó 18 como agente modulador de la composición de la microbiota intestinal en larvas de peces.
23. Uso de un alimento probiótico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 19 a 22 caracterizado por que los peces son peces planos.
- 30 24. Uso de un alimento probiótico según la reivindicación anterior caracterizado por que los peces son del género Solea.

25. Uso de un alimento probiótico según la reivindicación anterior caracterizado por que los peces son de la especie *Solea senegalensis*.
26. Uso de un alimento probiótico según la reivindicación anterior caracterizado por que comprende la adición de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 bioencapsulado en alimento vivo desde el inicio de la metamorfosis hasta el final del destete de los peces.
27. Uso de un alimento probiótico según la reivindicación anterior caracterizado por que comprende la adición de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 bioencapsulado en alimento vivo entre los días 10 y 86 posteriores a la eclosión (10 – 86 dpe) de los huevos de los peces.
28. Uso de un alimento probiótico según la reivindicación anterior caracterizado por que comprende la adición de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 bioencapsulado en alimento vivo entre los días 10 y 30 posteriores a la eclosión (10 – 30 dpe) de los huevos de los peces.
29. Uso de un alimento probiótico según la reivindicación 25 caracterizado por que comprende la adición de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 bioencapsulado en alimento vivo al inicio de la alimentación exógena de los peces.
30. Uso de un alimento probiótico según la reivindicación anterior caracterizado por que comprende la adición de *Shewanella putresfaciens* Pdp11 bioencapsulado en alimento vivo entre los días 2 y 20 posteriores a la eclosión (2 – 20 dpe) de los huevos de los peces.



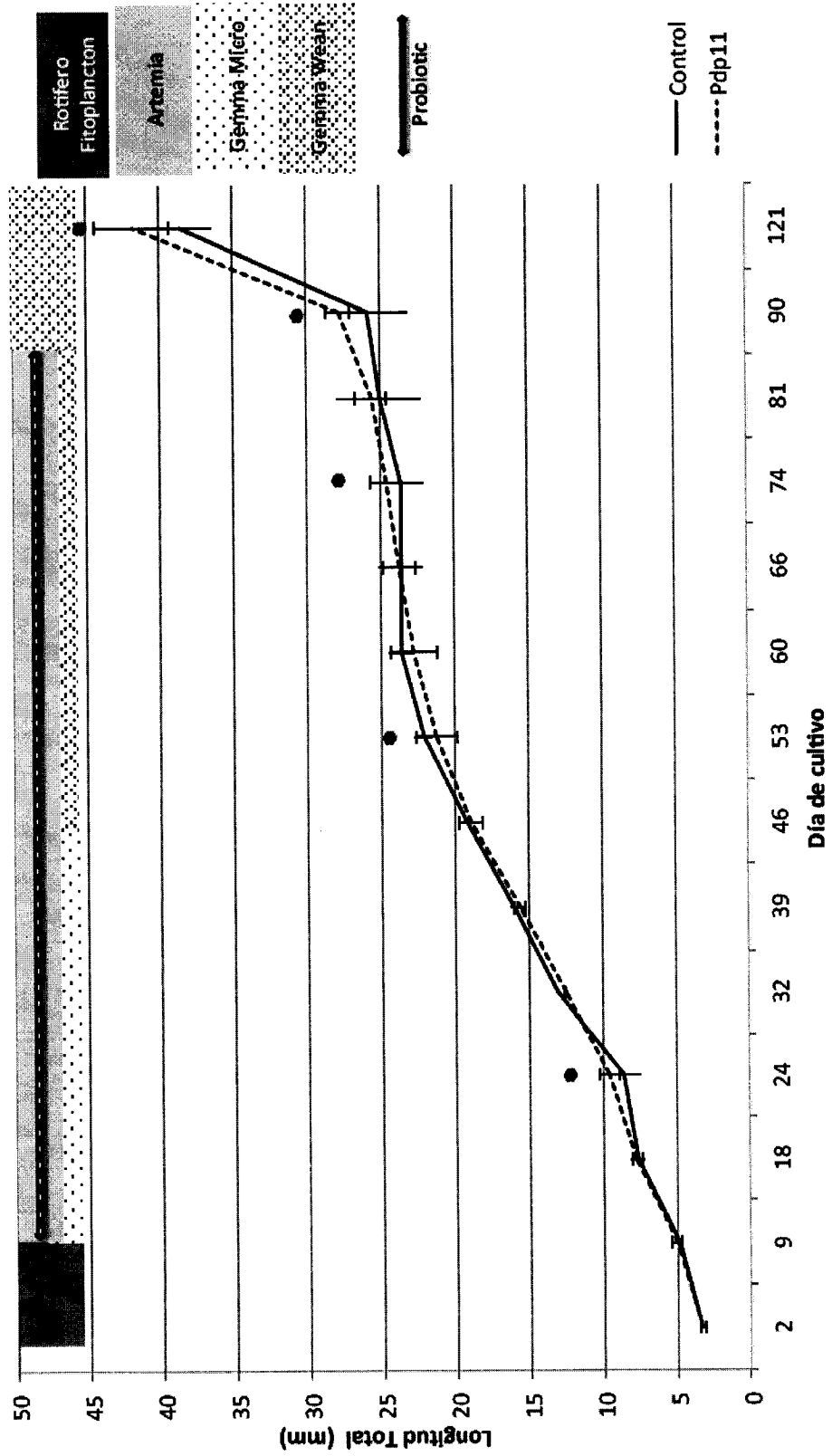


Figura 1 (a)

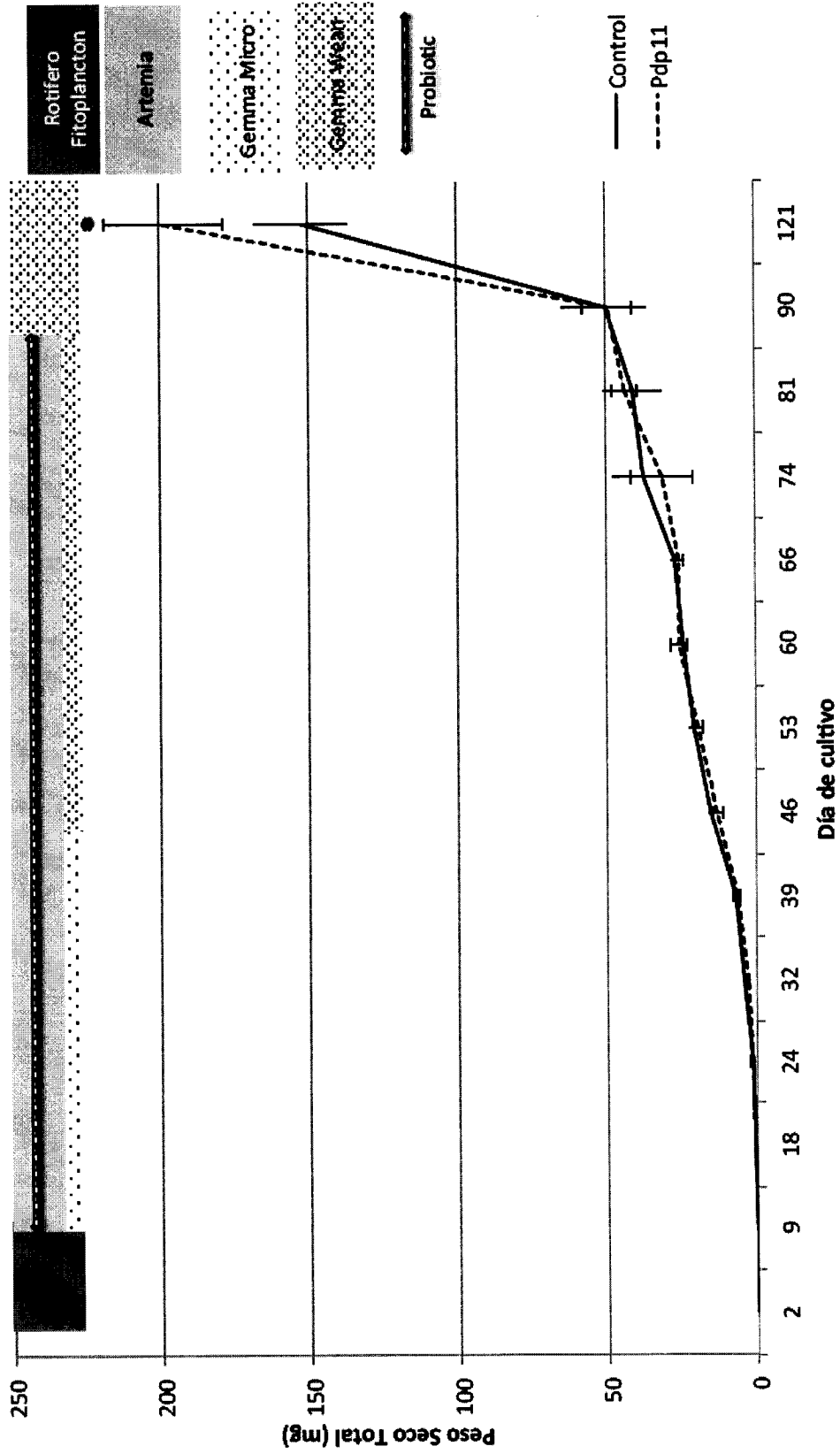


Figura 1 (b)

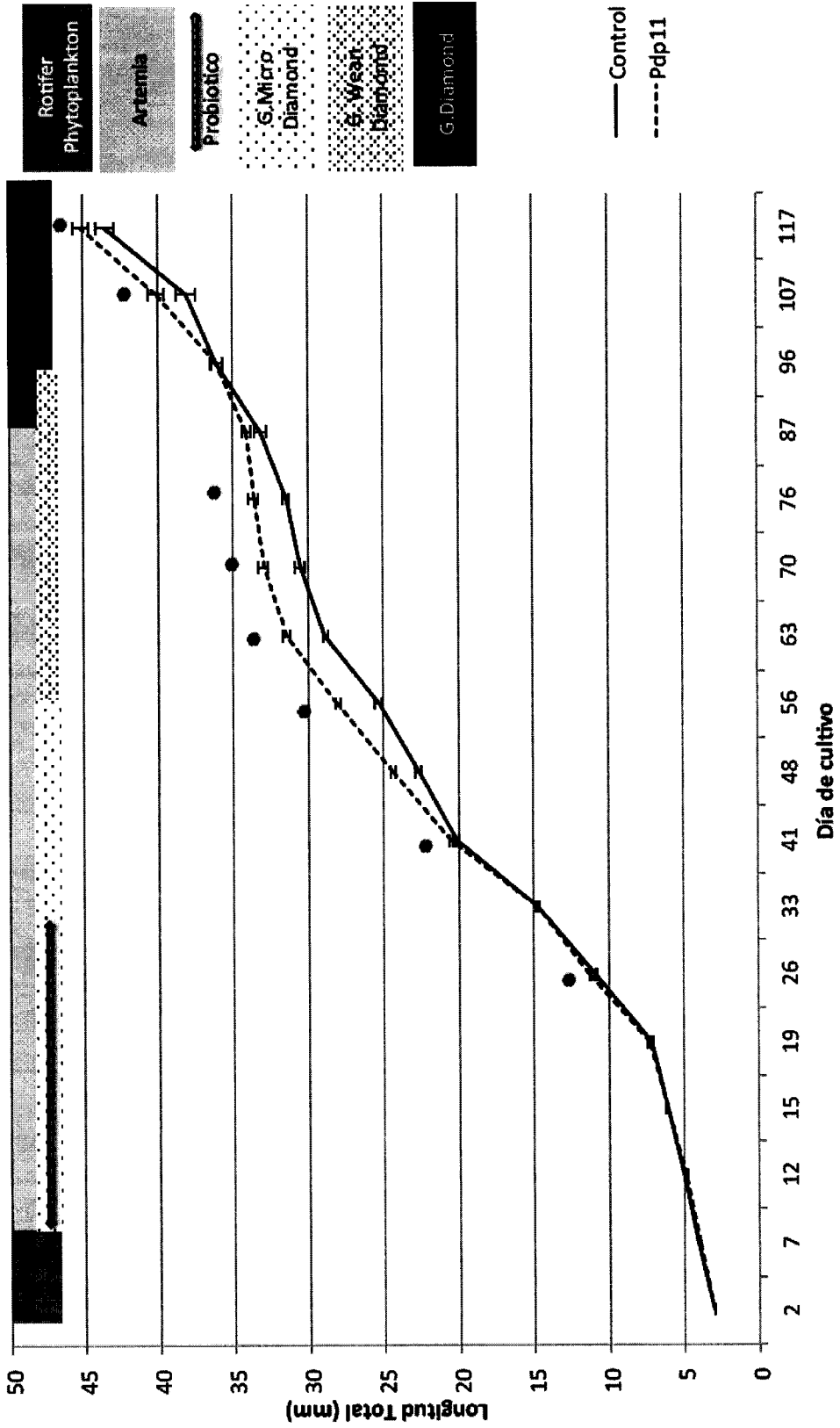


Figura 2 (a)

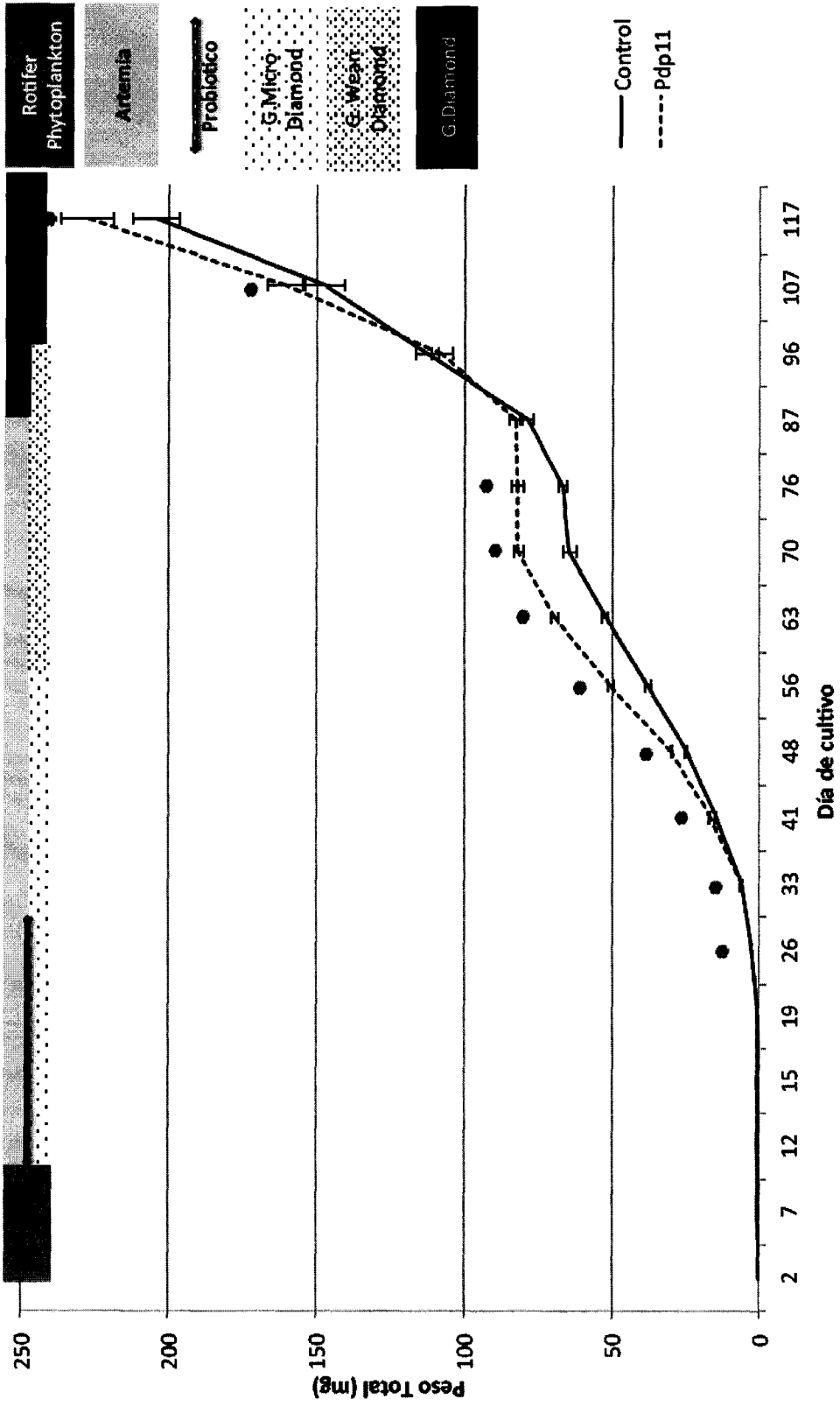


Figura 2 (b)

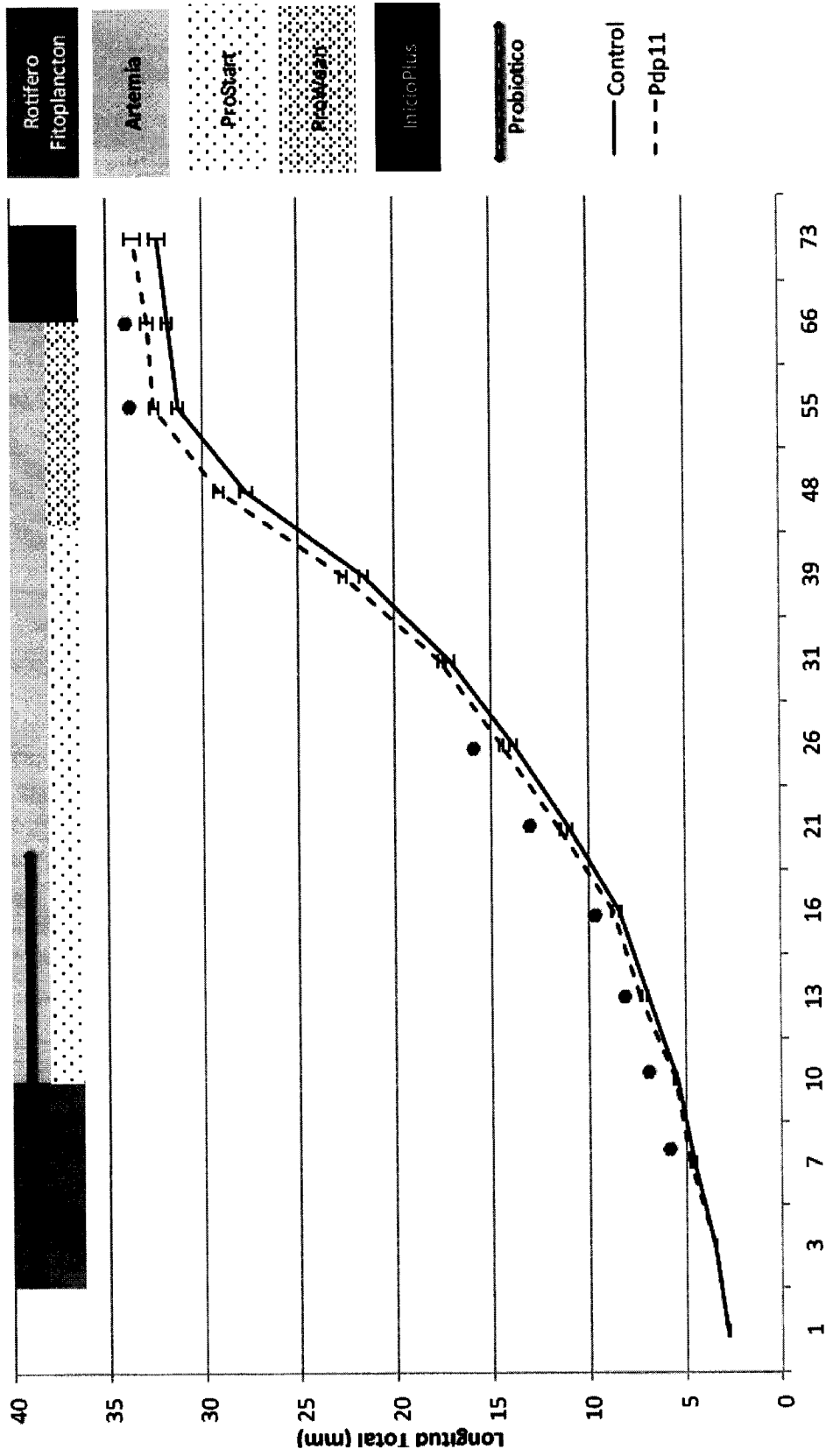


Figura 3 (a)

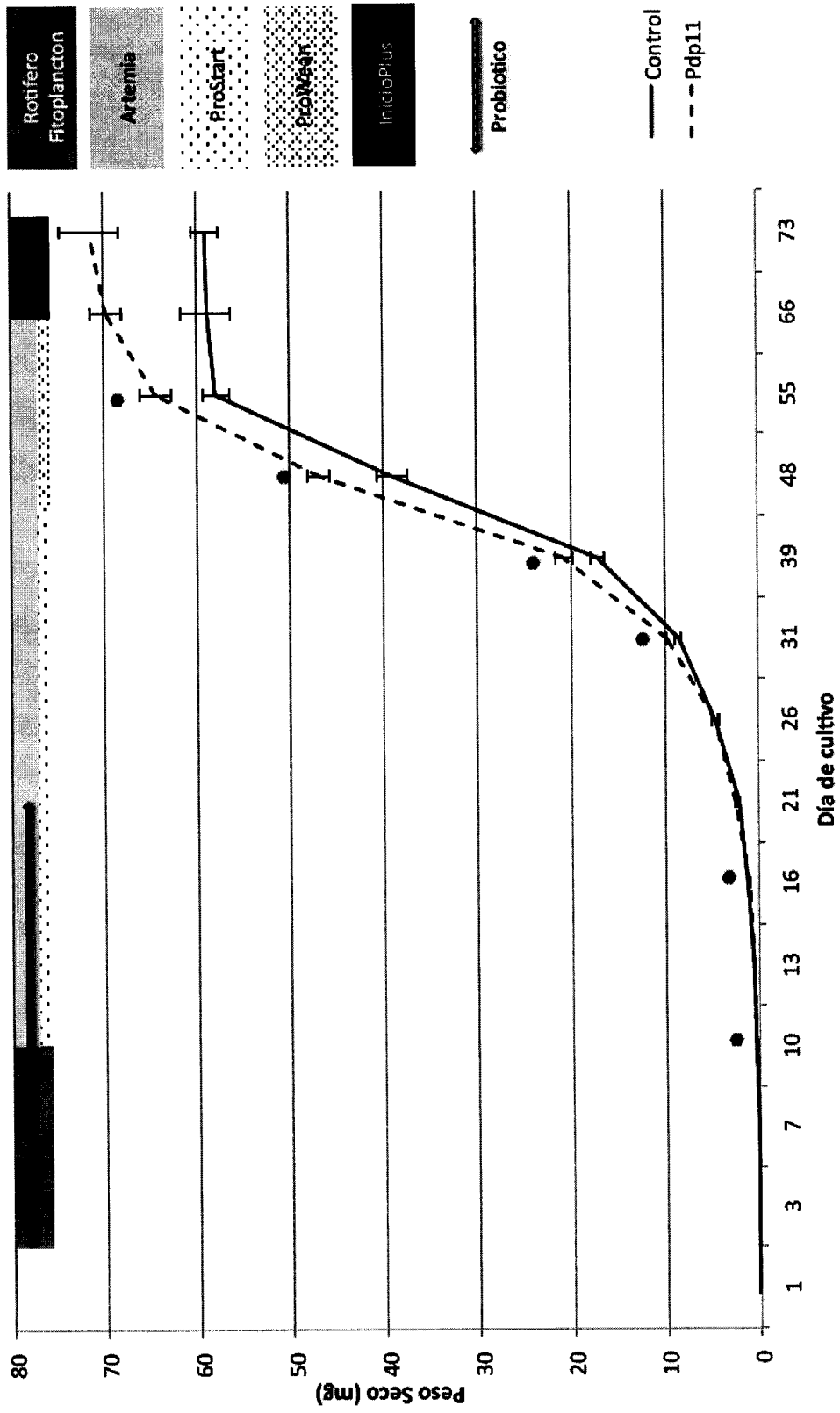


Figura 3 (b)

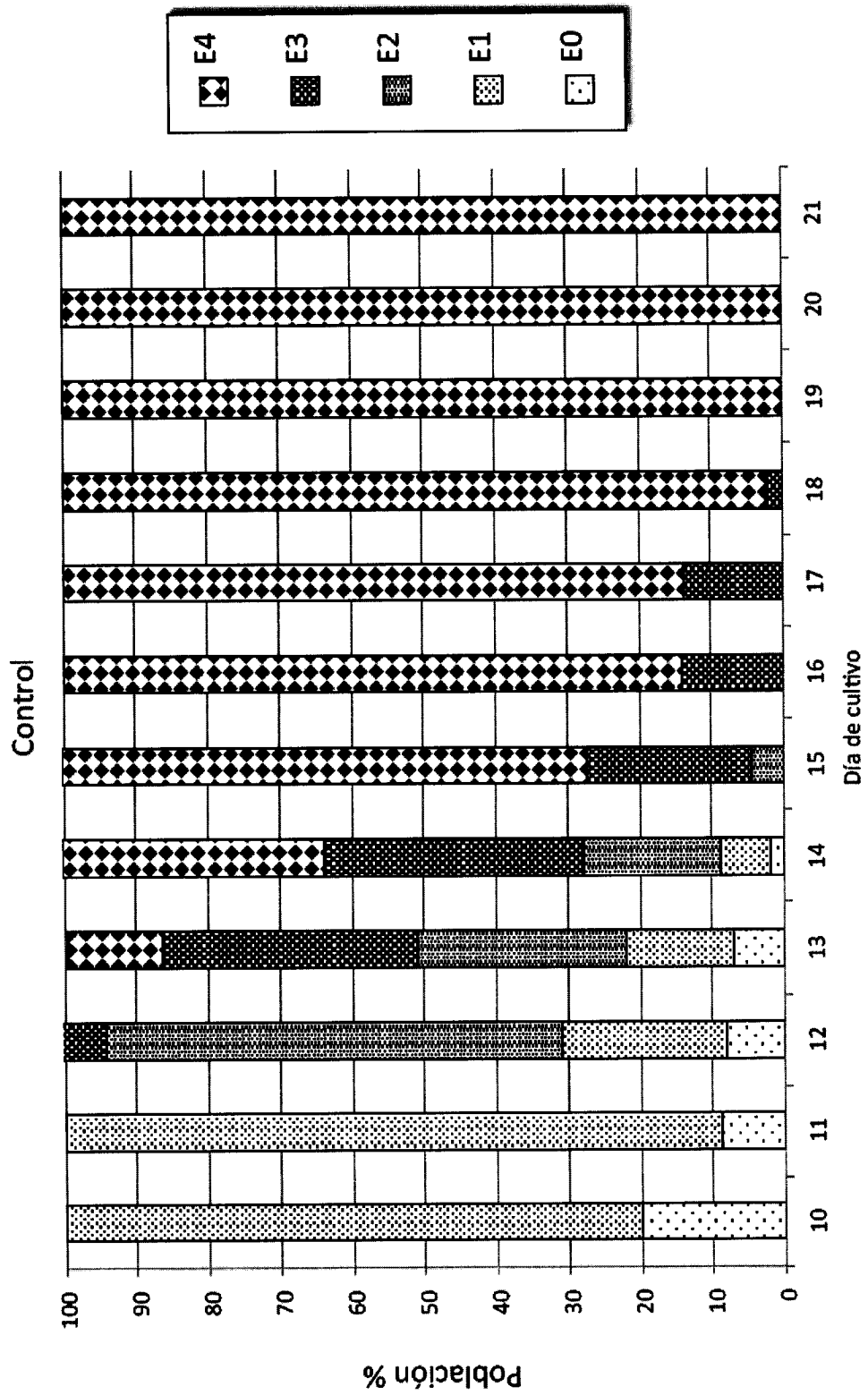


Figura 4 (a)

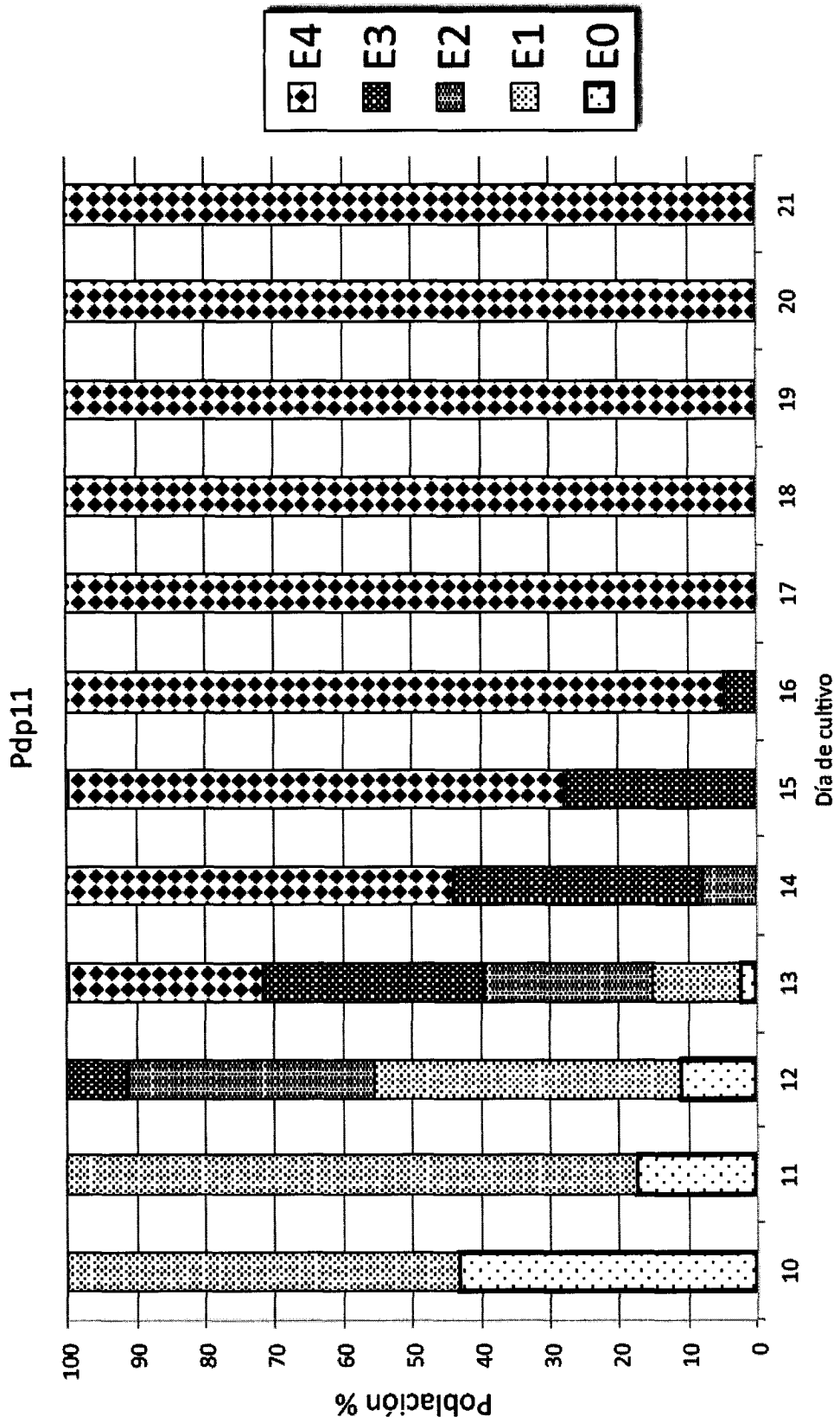


Figura 4 (b)



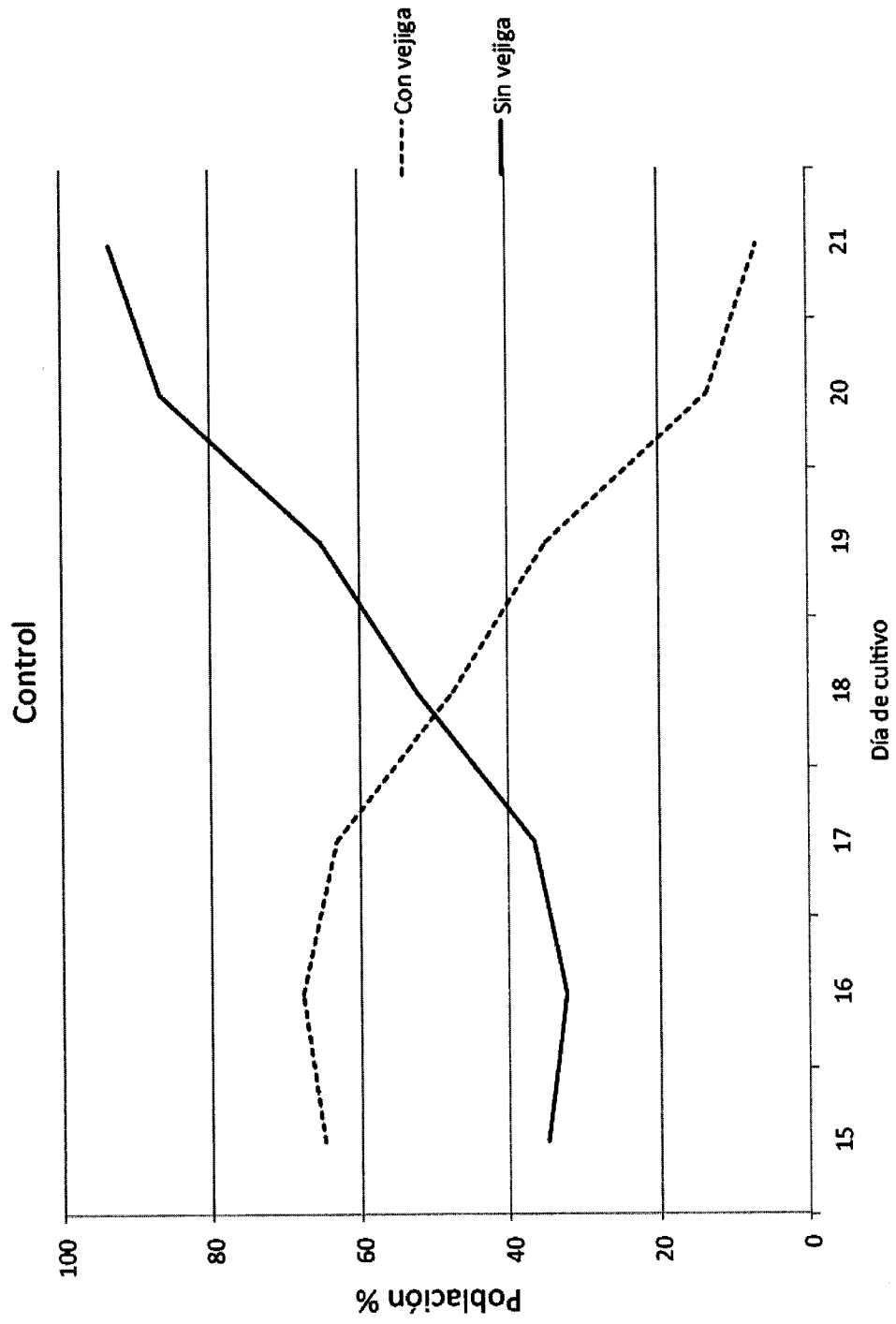


Figura 5 (a)

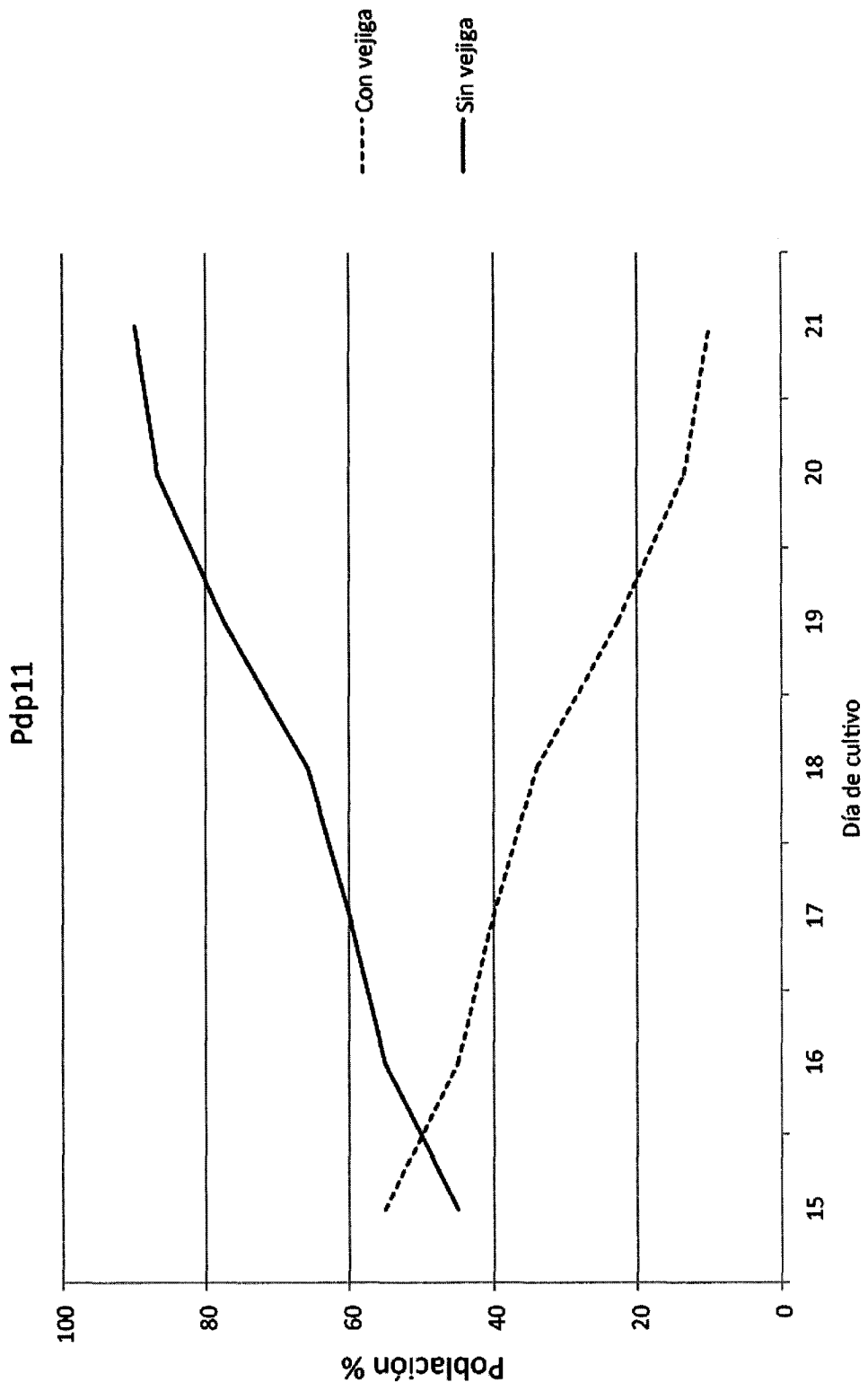


Figura 5 (b)

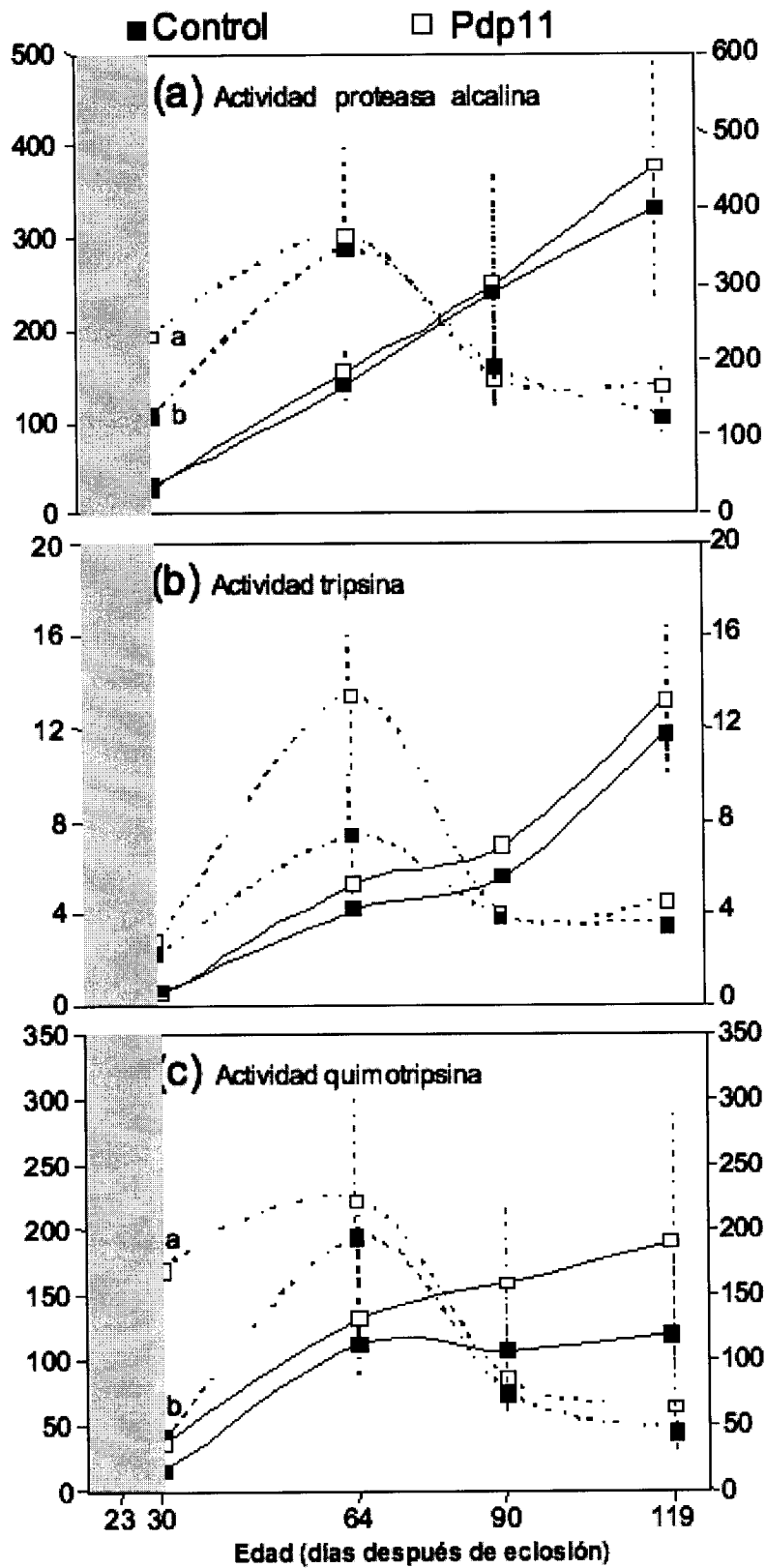
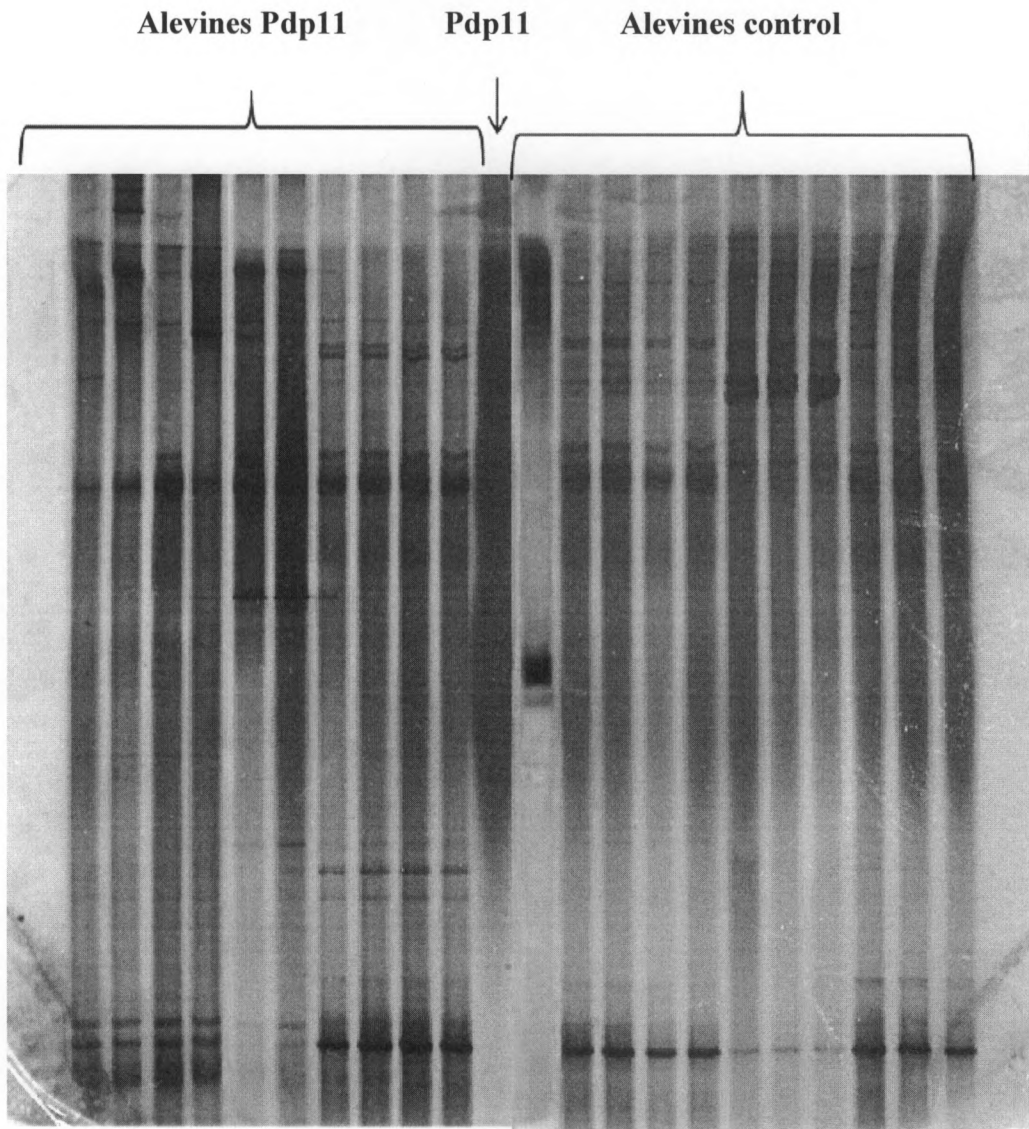


Figura 6



**Figura 7**

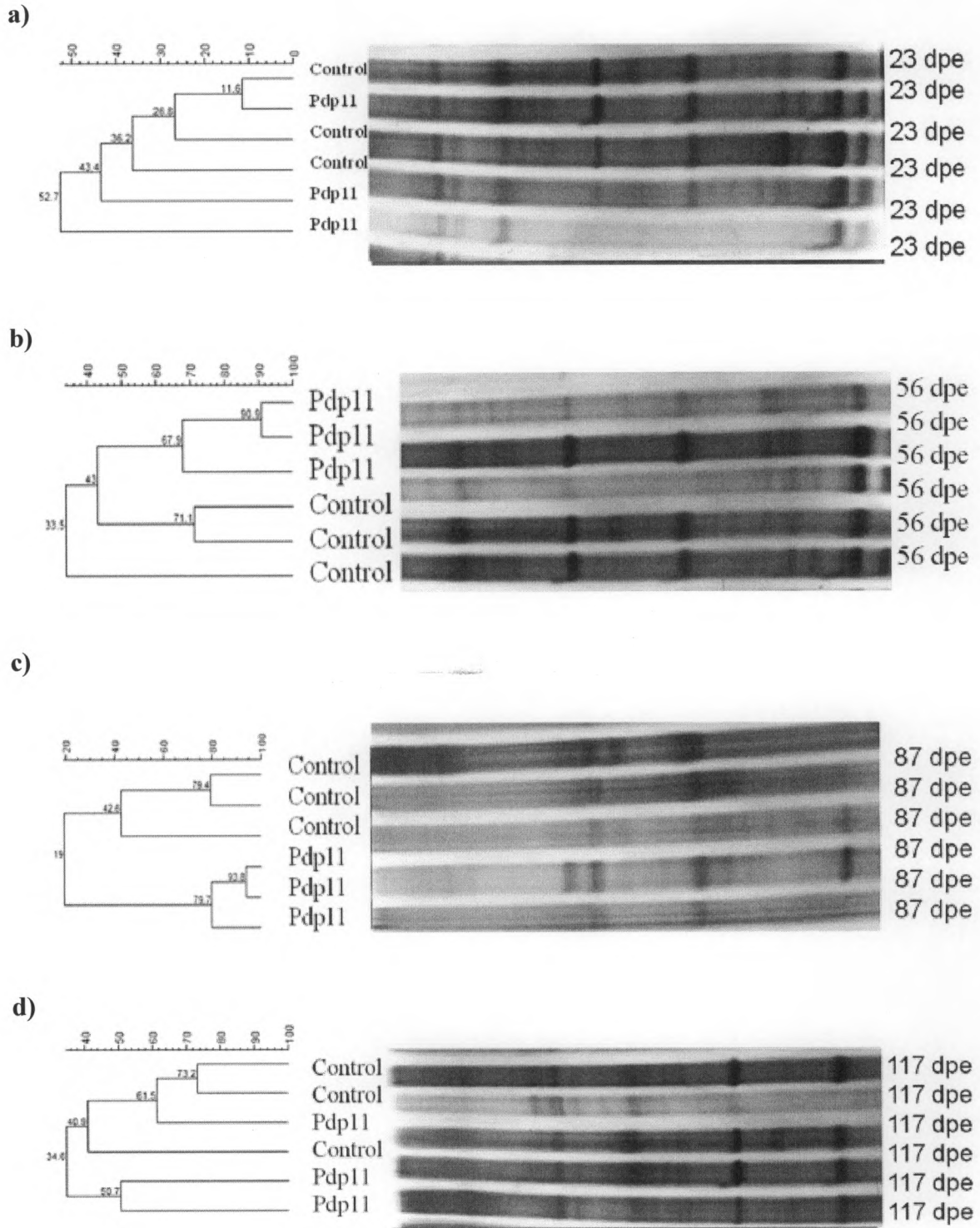


Figura 8

Dispersión de tallas % (CV)	Final de metamorfosis		Final de destete	
	Control	Pdp11	Control	Pdp11
<b>Experimento 1</b>	12,90 ± 1,10	6,20 ± 0,60	24,50 ± 3,50 <sup>a</sup>	14,40 ± 5,00 <sup>b</sup>
<b>Experimento 2</b>	4,89 ± 0,56 <sup>a</sup>	3,90 ± 0,66 <sup>b</sup>	12,89 ± 0,71 <sup>a</sup>	8,64 ± 2,72 <sup>b</sup>

**Tabla 1**

		Artemia Control	Artemia Pdp11	Peces Control	Peces Pdp11
<b>Experimento 1</b>	<b>Proteínas</b>	31,6 ± 0,9 <sup>b</sup>	36,5 ± 0,7 <sup>b</sup>	42,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	48,0 ± 0,2 <sup>b</sup>
	<b>Lípidos</b>	31,3 ± 0,8	30,7 ± 0,7	18,7 ± 1,8	17,7 ± 2,2
<b>Experimento 2</b>	<b>Proteínas</b>	36,4 ± 0,5	40,5 ± 2,0	57,3 ± 3,4 <sup>a</sup>	53,3 ± 1,7 <sup>b</sup>
	<b>Lípidos</b>	17,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	20,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	21,8 ± 0,9 <sup>a</sup>	23,0 ± 0,4 <sup>b</sup>

**Tabla 2**

		Artemia Control	Artemia Pdp11	Peces Control	Peces Pdp11
<b>Experimento 1</b>	<b>DHA</b>	6,85 ± 0,32 <sup>a</sup>	10,4 ± 0,57 <sup>b</sup>	13,84 ± 0,53	15,04 ± 0,07
	<b>DHA/EPA</b>	0,65 ± 0,07	0,78 ± 0,10	2,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,79 ± 0,09 <sup>b</sup>
<b>Experimento 2</b>	<b>DHA</b>	6,51 ± 0,27 <sup>a</sup>	10,83 ± 0,60 <sup>b</sup>	7,00 ± 1,68	8,66 ± 1,45
	<b>DHA/EPA</b>	1,77 ± 0,05	1,93 ± 0,11	3,13 ± 0,23	3,39 ± 0,25

**Tabla 3**